

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**Departamento de Biología Vegetal I**



**EFFECTO DEL GLIFOSATO SOBRE LA SIMBIOSIS  
"LUPINUS ALBUS-BRADYRHIZOBIUM" SP.  
("LUPINUS")**

**MEMORIA PRESENTADA PARA OPTAR AL GRADO DE  
DOCTOR POR**

Nuria de María de las Heras

Bajo la dirección de las Doctoras:

Mercedes Fernández-Pascual  
M<sup>a</sup> del Rosario de Felipe Antón

**Madrid, 2004**

**ISBN: 84-669-2474-4**

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**Departamento de Biología Vegetal I**

**EFFECTO DEL GLIFOSATO SOBRE LA  
SIMBIOSIS**

***Lupinus albus-Bradyrhizobium* sp. (*Lupinus*)**

**TESIS DOCTORAL**

**NURIA DE MARÍA DE LAS HERAS**

**Madrid, 2004**







UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA VEGETAL I



CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS  
CENTRO DE CIENCIAS MEDIOAMBIENTALES  
DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGIA Y BIOQUÍMICA VEGETAL

# **EFFECTO DEL GLIFOSATO SOBRE LA SIMBIOSIS**

## ***Lupinus albus-Bradyrhizobium* sp. (*Lupinus*)**

**Memoria presentada por Nuria de María de las Heras para optar al grado  
de Doctor en Ciencias Biológicas**

Firmado

Nuria de María de las Heras

Fdo. Los Directores

Dra. Mercedes Fernández-Pascual

Dra. M<sup>a</sup> del Rosario de Felipe Antón



*Desde que comencé esta Tesis Doctoral, he conocido y recibido el apoyo de numerosas personas a las que quiero expresar mi agradecimiento porque, de una manera u otra, han contribuido y son parte de este trabajo.*

*Quiero agradecer en primer lugar a la Dra. Mercedes Fernández-Pascual, directora de la presente Tesis, su ayuda en mis inicios en el mundo de la investigación y su contribución en mi formación científica. También quisiera agradecerle su apoyo, disposición e ilusión constantes en la realización de esta Tesis.*

*Quisiera agradecer a la Dra. M<sup>a</sup> Rosario de Felipe, directora de la presente Tesis, por ofrecerme la posibilidad de integrarme dentro de su grupo de trabajo, el interés que siempre ha manifestado y el empeño en la revisión de este trabajo.*

*Quiero agradecer a M<sup>a</sup> Luisa Martín el haber formado parte de esta tesis como tutora.*

*También quisiera agradecer al conjunto de los investigadores del Departamento de Fisiología y Bioquímica Vegetal del Centro de Ciencias Medioambientales (CSIC), toda la ayuda prestada. Gracias a la Dra. Pilar Golvano, por aprender de ella lo mejor de las “enzimas” y por dar ese toque tan genuino al laboratorio. Gracias a la Dra. Mercedes Lucas, por la atención que siempre me ha demostrado en lo personal y en el trabajo, y por lo mucho que he aprendido de ella. Gracias al Dr. José Javier Pueyo, por sus consejos y por haber resuelto muchas de mis dudas y al Dr. José Manuel Pozuelo por su interés y apoyo. También quisiera agradecer a la Dra. Elena Fedorova, el haberme mostrado otra forma de conjugar la ciencia y su entusiasmo en nuestras discusiones sin fin sobre lo que hiciera falta.*

*Gracias a Carmen, Maribel, Cesar, Marisa, y Paquita, su apoyo y amistad en el día a día del trabajo han sido de gran ayuda para mí.*

*Y cómo no iba a agradecer la empatía de mis compañeros del laboratorio, sin los cuales este trabajo posiblemente se hubiera acabado, pero sin nada que lo hiciera tan especial de recordar.*

*A mi amiga y compañera Cristina, gracias por recibirme como lo hiciste, por dar los primeros pasos conmigo, por animarme a enseñar lo mejor de mí, por ser tan generosa conmigo, fuera y dentro del trabajo, gracias por conseguir una de las cosas más difíciles de hacer: que el trabajo juntas cada día fuera más gratificante.*

*A Lola, con la que más he vivido y pasado, gracias por tu ayuda en todo momento, por nuestras maravillosas conversaciones, por resolver y contestar a mis interminables preguntas, en definitiva por tu complicidad cuando no había palabras.*

*A mi vecino y ya doctor Alfonso, gracias por ayudarme con mi primer ADN, por hacerme pensar con cada una de tus sugerencias y por darme ejemplo con tu trabajo. ¡Dejaste el listón bien alto!*

*A Teo, por ser tan sencillo y mostrarme su apoyo en todo momento y a Claudia por tu ayuda como Dra. de filogenias.*

*A Paco, que siempre transmite vitalidad, y ha contado conmigo en los grandes eventos tan divertidos.*

*A Mariam, tu ayuda con las enzimas me ha sido muy útil.*

*A Ana, gracias por ser de la mejor cosecha: del 70, por aconsejarme y ayudarme en la etapa más delicada, por ver siempre lo positivo de mí y darme ese ejemplo de lo que es el trabajo bien hecho.*

*A Beatriz, su buena disponibilidad, consejos y discusiones de ciencia o de sus niñas, han sido de gran ayuda para mí.*

*Me gustaría además dar las gracias a mis antiguos compañeros. A Sonia por todo su apoyo y sobre todo por haber compartido mi nombre durante tanto tiempo con tan buen*

talante. A Gregorio por lo que nos hemos reído, aún trabajando y a Marisa por sus sabias observaciones.

*En el Centro de Ciencias Medioambientales también muchas personas me han ayudado facilitándome el día a día en el trabajo. Quiero dar las gracias a Clara, Pilar, Lola y José por su ayuda bibliográfica, a Julio por solucionar lo insolucionable, a Fernando por su inestimable ayuda en el mundo microscópico y a mis compañeros del CCMA que me han acompañado en las mejores comidas y reuniones extralaborales, M<sup>a</sup> Angeles, Arancha, Miguel, Bea, Judit, etc., porque todos hemos compartido la misma etapa.*

*También quiero agradecer, muy especialmente, a la Dra. Maite Serra y a la Dra. Isabel García-Luque del Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC), por haberme permitido establecerme en su laboratorio durante casi diez meses. Gracias por enseñarme algunos de vuestros conocimientos de biotecnología. Sin olvidar vuestra buena disponibilidad, sugerencias y el ánimo que me transmitisteis en todo momento celebrando conmigo todos nuestros éxitos.*

*Cuando llegue al CIB para estar una semana, realmente fueron los buenos compañeros que tuve los que me hicieron alargarlo a unos meses más, por esto quiero daros a cada uno de vosotros las gracias por haberme hecho sentir como en casa. En especial, gracias a M<sup>a</sup> Angeles por enseñarme a buscar y encontrar nuestra querida secuencia ¡Al fin lo conseguimos! a Israel, Margot, Gema, Miriam, Antonio, Alfonso, Mercedes y Marisa con los que he compartido tan buenos momentos.*

*Durante mi estancia en Bilbao también recibí la ayuda y el apoyo de los Drs. José M<sup>a</sup> Becerril, Antonio Hernández e Ignacio García; a todos ellos les quiero expresar mi agradecimiento por su acogida, por lo que me enseñaron de HPLC, por sus consejos y su interés posterior a mi fugaz visita.*

*También quiero agradecer a mis amigos de siempre, que aún no estando dentro de este mundillo me han animado a continuar en él, a pesar de los desánimos que a veces causa, muy especialmente a mi amiga Elisa porque desde antes de que la tesis fuera tal, ha creído en su realización y en mí.*

*Finalmente quiero dar las gracias a mi familia. En primer lugar a mi madre, porque no sólo me ha apoyado en este trabajo y en todo lo que he querido, sino que me ha animado a alcanzarlo y sólo ella ya sabía que estaba conseguido antes de acabarlo. Gracias por educarme de acuerdo a tus valores permitiéndome decidir los míos, porque me han traído hasta aquí. También quiero agradecer a mis hermanos su constante apoyo y ánimo a lo largo de estos años. En especial a mi hermana, por tanto como hemos compartido. Su ejemplo siempre ha hecho que no vea obstáculos en alcanzar mis ilusiones. A mi hermano el peque por ayudarme y facilitarme (sin intereses) la mayor parte del equipo informático para la realización de esta Tesis y a mi sobrina por siempre hacerme olvidar las cosas que no merece la pena recordar.*

*Por último, quiero dar las gracias a Miguel Angel por llevar y compartir mis momentos más estresantes y sobre todo, por enseñarme a ver la vida de la mejor manera de entenderla, con mucho sentido del humor. GRACIAS.*

*A Matilde*

*A Almudena*

*A Carlota*

*A Luis*

*A Miguel Angel*



## *ÍNDICE*







<b>ÍNDICE</b>	11
<b>ABREVIATURAS</b>	17
<b>INTRODUCCIÓN</b>	21
1. Fijación biológica de nitrógeno, alternativa a la fertilización nitrogenada	22
2. Interacción planta- <i>Rhizobium</i>	22
3. Fisiología del nódulo	26
4. Simbiosis <i>Lupinus</i> sp.- <i>Bradyrhizobium</i> sp. ( <i>Lupinus</i> )	29
5. Metabolismo del carbono en nódulos	32
6. Metabolismo proteico en condiciones de estrés	38
6.1. Acuaporinas en simbiosis, porinas	38
7. Herbicidas	40
7.1. Herbicidas y fijación de nitrógeno	40
7.2. Glifosato: características	42
7.2.1. Modo de acción	43
7.2.2. Efectos adversos	45
7.2.3. Interacción de la resistencia fisiológica	46
8. Metabolismo fenólico	47
<b>OBJETIVOS</b>	51
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	55
1. Materiales	55
1.1. Material vegetal	55
1.2. Microorganismos	55
1.3. Medios de cultivo	55
1.4. Oligonucleótidos	55
1.5. Herbicida	55
2. Métodos	56
2.1. Siembra, inoculación y crecimiento vegetal	56
2.2. Condiciones de cultivo bacteriano	57
2.3. Estimación del crecimiento bacteriano y número de viables	57
2.4. Aplicación del tratamiento en plantas y microorganismos	57
2.5. Determinación de la actividad nitrogenasa	58

2.6. Técnicas de bioquímica de proteínas .....	59
2.6.1. Extracción y cuantificación .....	59
2.6.2. Electroforesis de proteínas .....	59
2.6.3. Análisis <i>Western blot</i> .....	60
2.6.4. Secuenciación de la proteína BLpp y análisis de la secuencia .....	61
2.6.5. Aislamiento de bacteroides .....	62
2.7. Estudio del metabolismo del carbono .....	62
2.7.1. Medida de las actividades enzimáticas .....	62
2.7.1.1. Extracciones enzimáticas .....	62
2.7.1.2. Valoración de las actividades enzimáticas ...	63
2.7.1.3. Actividad fosfoenolpiruvato carboxilasa .....	64
2.7.1.4. Actividad malato deshidrogenasa .....	64
2.7.1.5. Actividad aspartato aminotransferasa .....	65
2.7.1.6. Actividad sacarosa sintasa .....	65
2.7.2. Almidón .....	66
2.7.2.1. Extracción .....	66
2.7.2.2. Determinación de almidón .....	66
2.7.3. Sacarosa .....	67
2.7.3.1. Extracción .....	67
2.7.3.2. Determinación .....	67
2.8. Estudio del metabolismo fenólico .....	67
2.8.1. Extracción de fenoles .....	67
2.8.2. Determinación de fenoles .....	68
2.9. Técnicas de microscopía .....	68
2.9.1. Procesamiento del material vegetal .....	68
2.9.1.1. Inclusión en la resina acrílica LR White .....	69
2.9.1.2. Inclusión en la resina hidrofóbica. Araldita ....	69
2.9.2. Microscopía óptica de campo claro .....	70
2.9.2.1. Localización histoquímica de carbohidratos .	71
2.9.3. Microscopía electrónica de transmisión .....	71
2.9.3.1. Inmunolocalización .....	71
2.9.3.2. Microscopía electrónica de barrido a baja temperatura .....	72
2.10. Clonación de productos de PCR .....	72
2.11. Transformación bacteriana por electroporación .....	72
2.11.1. Preparación de bacterias .....	72

2.11.2. Electroporación.....	73
2.12. Manipulación enzimática .....	73
2.13. Electroforesis de ADN .....	73
2.14. Elución de fragmentos de ADN de geles de agarosa .....	73
2.15. Extracción de ADN genómico.....	74
2.16. Extracción de ARN .....	74
2.17. Purificación de ADN plasmídico .....	75
2.18. Reacción de amplificación por PCR del ADN genómico .....	75
2.19. Reacción de amplificación por PCR de colonias.....	76
2.20. Rastreo del ADN genómico .....	76
2.21. Síntesis de Sondas de ARN .....	77
2.22. Análisis <i>Southern blot</i> .....	77
2.22.1. Electroforesis y transferencia .....	77
2.22.2. Hibridación.....	78
2.23. Análisis <i>Northern blot</i> .....	79
2.23.1. Electroforesis y transferencia .....	79
2.23.2. Hibridación.....	79
2.24. Secuenciación de ADN y análisis de las secuencias .....	79
2.25. Predicción del modelo estructural BLpp .....	80
2.26. Hibridación <i>in situ</i> .....	80
2.26.1. Preparación de los cortes.....	80
2.26.2. Hidrólisis alcalina de la sonda .....	80
2.26.3. Hibridación.....	81
2.27. Análisis estadísticos de los resultados .....	81
<b>RESULTADOS</b> .....	85
1. Efecto del glifosato sobre diferentes parámetros fisiológicos en plantas de <i>Lupinus albus</i> L. cv. Multolupa.....	85
1.1 Sintomatología y crecimiento de <i>Lupinus albus</i> L. cv. Multolupa .....	85
1.2 Efecto del glifosato sobre la actividad fijadora de nitrógeno .....	88
2. Efecto del glifosato sobre el crecimiento microbiano de <i>Bradyrhizobium</i> sp ( <i>Lupinus</i> ) .....	89
3. Cambios en el metabolismo carbonado del nódulo .....	92
4. Actividades enzimáticas del nódulo PEPC, MDH y AST .....	94
5. Estudio de las alteraciones estructurales por glifosato en nódulos y hojas de <i>Lupinus albus</i> .....	96
5.1. Efecto sobre la estructura nodular.....	96

5.2. Efecto del glifosato en la ultraestructura del aparato fotosintético ....	102
5.3. Efecto del glifosato en la ultraestructura del nódulo .....	107
5.4. Inmunolocalización de leghemoglobina.....	108
6. Alteraciones en el metabolismo fenólico.....	113
7. Diferencias en el contenido y en el patrón de acumulación proteico en plantas de <i>Lupinus albus</i> tratadas con glifosato.....	117
8. Caracterización del polipéptido BLpp bacteroidal de 44 kDa.....	125
8.1. Análisis de la secuencia aminoacídica de la región N-terminal de BLpp .....	125
8.2. Clonación y caracterización de la secuenciación nucleotídica de <i>blpp</i> .....	126
8.3. Análisis de la secuencia nucleotídica y aminoacídica deducida de <i>blpp</i> .....	128
8.4. Predicción del modelo estructural de BLpp .....	132
8.5. Análisis genómico por <i>Southern blot</i> .....	135
8.6. Análisis de la expresión del gen <i>blpp</i> .....	135
8.7. Localización de los transcritos de <i>blpp</i> .....	138
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>141</b>
1. Sintomatología y parámetros de crecimiento.....	141
2. Efecto del herbicida sobre la fijación de nitrógeno.....	144
3. Cambios en la ultraestructura del nódulo y del cloroplasto en plantas de <i>Lupinus albus</i> tratadas con glifosato .....	146
4. Efecto del glifosato sobre la leghemoglobina .....	149
5. Metabolismo carbonado.....	151
5.1. Sacarosa y almidón .....	151
5.2. Sacarosa sintasa .....	153
5.3. PEPc, MDH y AST.....	154
6. Efecto del glifosato sobre el crecimiento de <i>Bradyrhizobium</i> sp ( <i>Lupinus</i> ).....	156
7. Efecto del glifosato sobre el metabolismo fenólico .....	158
8. Alteraciones producidas por el glifosato sobre el metabolismo proteico .....	160
9. Caracterización del polipéptido BLpp bacteroidal de 44 kDa.....	162
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>175</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>177</b>



## *ABREVIATURAS*







aa	Aminoácido (s)
A	Adenina
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
ARN	Ácido ribonucleico
ARNr	Ácido ribonucleico ribosómico
ATP	Adenosina trifosfato
AST	Aspartato aminotransferasa
BCIP	5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato
BrEt	Bromuro de etidio
BSA	Albúmina de suero bovino
C	Citosina
CAM	Metabolismo ácido de las crasuláceas
dATP	Desoxiadenosina trifosfato
dCTP	Desoxicitidina trifosfato
DEPC	Dietil pirocarbonato
dGTP	Desoxiguaninidina trifosfato
DMSO	Dimetilsulfóxido
DO	Densidad óptica
dTTP	Desoxitimidina trifosfato
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
EPSPs	5-enolpiruvilshikimato-3 fosfato sintasa
G	Guanina
g	Gramo
GTP	Guanosina trifosfato
H	Hora (s)
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
Ig	Inmunoglobulina
kb	Kilobase(s)
kDa	Kilodalton(s)
l	Litro
Lb	Leghemoglobina
M	Molar
MDH	Malato deshidrogenasa
MIP	Proteínas intrínsecas de membrana
MPB	Membrana peribacteroidal
min	Minuto(s)
mM	Milimolar
μl	Microlitro
ml	Mililitro
μg	Microgramo
mg	Miligramo
MOPS	Ácido 3 (N-morfolino) propanosulfónico
NBT	Azul de nitrotetrazolio
ng	Nanogramo
nm	Nanómetro
OAA	Ácido oxalacético
pb	Pares de bases
PAGE	Electroforesis en geles de poliacridamida
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PEP	Ácido fosfoenolpirúvico
PEPc	Fosfoenolpirúvico carboxilasa
PVP	Polivinil pirrolidona

## *Abreviaturas*

PVPP	Polivinil polipirrolidona
RUBISCO	1,5- rubisco bifosfato carboxilasa/oxigenasa
rpm	Revoluciones por minuto
s	Segundo (s)
SDS	Dodecil sulfato sódico
SDS-PAGE	Electroforesis en geles de poliacridamida en presencia de SDS
SE	Error estándar
T	Timina
TEA	Trietanolamina
TEMED	N,N,N',N'- tetrametiletilendiamina
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
U	Uracilo
UTP	Uridina trifosfato
UI	Unidad internacional
UV	Ultravioleta
V	Voltio
VDAC	canales aniónicos dependientes de voltaje
W	Wattios



## *INTRODUCCIÓN*







## 1. Fijación biológica de nitrógeno, alternativa a la fertilización nitrogenada

El nitrógeno es el elemento mayoritario en la atmósfera terrestre y sin embargo es el principal factor limitante para el desarrollo de las plantas, después del agua. Esta paradoja se debe a que el nitrógeno molecular ( $N_2$ ), no es asimilable por los seres vivos. Los sistemas biológicos sólo pueden incorporar el  $N_2$  de forma combinada como nitrato  $NO_3^-$  o como amonio  $NH_3^+$ , por lo que la aplicación de fertilizantes nitrogenados es una práctica común en los sistemas agrarios. Sin embargo, el uso creciente de fertilizantes nitrogenados para conseguir un aumento de la productividad agrícola implica un elevado coste y ocasiona acumulación de compuestos nitrogenados tóxicos en el medioambiente (Zahran *et al.*, 2001), con el consiguiente daño para la salud humana.

La fijación biológica de nitrógeno (FBN), es un proceso natural y eficiente responsable de la mayor parte del nitrógeno fijado a los ecosistemas terrestres (Zahran *et al.*, 1999, 2001). Además es una biotecnología agrícola limpia y respetuosa con el medioambiente y por lo tanto supone una alternativa a la fertilización nitrogenada, ya que puede paliar muchos de los efectos negativos de los fertilizantes (Newton, 2000; Fernández-Pascual *et al.*, 2002; de Felipe, 2002).

La FBN es llevada a cabo por organismos procariontes en vida libre o en asociaciones simbióticas con plantas y consiste en la reducción de nitrógeno molecular a amoniaco. Una de las asociaciones simbióticas de mayor interés agronómico es la establecida entre diferentes géneros bacterianos denominados rizobios y plantas de la familia *Leguminosae*, y también excepcionalmente con un género de la familia *Ulmaceae* (*Parasponia*).

La familia *Leguminosae* comprende entre 670 y 750 géneros y entre 18.000 y 19.000 especies distribuidas en tres subfamilias: *Caesalpinioideae* en la que se incluyen numerosas especies tropicales, con un 23% de especies noduladas, *Mimosoideae* a la que pertenecen especies arbóreas, con un 90% de especies noduladas, y *Papilionoideae*, la mayor subfamilia, con especies de elevada importancia agronómica, con un 97% de especies noduladas (de Faria, 1989; Doyle y Luckow, 2003; Lewis *et al.*, 2003; Graham y Vance, 2003). Esta familia tiene gran importancia en la alimentación humana y animal. Las leguminosas grano, contribuyen el 33% del nitrógeno de la dieta proteíca necesario para el hombre (Vance *et al.*, 2000) y constituyen en muchos países la segunda fuente de proteínas después de los cereales. Además aportan las cantidades de lisina, aminoácido esencial sintetizado por plantas y microorganismos a partir del aspartato, deficiente en los cereales (Mahé *et al.*, 1994). Mientras las especies forrajeas proporcionan hojas y tallos

para la alimentación ganadera, las leguminosas de grano son utilizados para la producción de aceites comestibles como el cacahuete y la soja.

Holt *et al.*, 1994 en el manual Bergey's de determinación bacteriológica (2000) describe la familia *Rhizobiaceae*, constituida por bacilos móviles del suelo Gram negativos, aeróbios, con presencia de flagelos y sin endosporas; cinco géneros forman simbiosis con leguminosas: *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Protorhizobium*, *Rhizobium* y *Sinorhizobium*. Sin embargo, los análisis filogenéticos basados en la comparación de las secuencias del ADN ribosómico 16S han permitido revisar la clasificación de estas bacterias simbióticas (van Berkum y Eardly, 1998; Wang y Martínez-Romero, 2000; Sawada *et al.*, 2003). Actualmente se reconocen cuatro familias distintas: *Rhizobiaceae* comprende los géneros *Rhizobium* y *Sinorhizobium*, *Phyllobacteriaceae* incluye a *Mesorhizobium* y *Allorhizobium*, *Hyphomicrobiaceae*, a la que pertenece el género *Azorhizobium* y *Bradyrhizobiaceae*, representada por *Bradyrhizobium* (Garrity *et al.*, 2001).

Recientemente han sido establecidos cambios en la sistemática entre bacterias fijadoras de nitrógeno y leguminosas confirmándose doce géneros de rizobios con un total de 44 especies, distribuidos en dos clases: Alphaproteobacteria y Betaproteobacteria y dispersas en los 9 grupos monofiléticos siguientes: *Rhizobium* y *Allorhizobium*; *Sinorhizobium*; *Mesorhizobium*; *Bradyrhizobium*; *Metylobacterium nodulans*; *Azorhizobium*; *Devosia neptúnea*; *Burkholderia* y *Ralstonia taiwanensis* (Sawada, 2003).

El género *Bradyrhizobium*, está constituido por bacilos de 0,5-0,9 x 1,2-3,0  $\mu\text{m}$ , con un flagelo polar o subpolar. Es de crecimiento lento y productor de alcali. Dentro de este género se reconocen tres especies: *Bradyrhizobium japonicum* (especie tipo), *B. elkanii* (Kuykendall *et al.*, 1992) y *B. liaoningense* (Xu *et al.*, 1995) con capacidad de nodular la soja (*Glycine max*). Cuando se aíslan de otras especies vegetales como *Lupinus* y otras leguminosas tropicales se denominan *Bradyrhizobium* spp. De estas especies identificadas, ninguna tiene plásmido simbiótico y los genes simbióticos están localizados en el cromosoma.

## 2. Interacción planta-*Rhizobium*

El establecimiento de la simbiosis es un proceso complejo que está regulado por el simbionte vegetal (Kiers *et al.*, 2003). En la interacción simbiótica los rizobios reconocen específicamente la leguminosa huésped para que se establezca la simbiosis.

En la asociación simbiótica es la planta la que suministra la energía y el sistema de protección necesario para que la bacteria lleve a cabo el proceso de fijación de nitrógeno, a través del desarrollo de un nuevo órgano, el nódulo. Esta fijación enzimática

del nitrógeno se realiza en el nódulo radical, donde se crean las condiciones bioquímicas necesarias para el proceso.

Recientemente se ha insistido en el estudio del control del macrosimbionte en la simbiosis leguminosa-*Rhizobium*. La planta seleccionaría los rizobios cooperativos imponiendo “sanciones” sobre la cantidad básica de N<sub>2</sub> que el rizobio fijará dentro del nódulo, constituyendo una forma en la que el huésped controlaría los recursos medioambientales de su simbiote e impondría un ambiente selectivo que favoreciera la cooperación (Kiers *et al.*, 2003).

Durante la formación del nódulo tienen lugar dos procesos: la infección y la organogénesis nodular. Estos dos procesos ocurren simultáneamente, a través de lo que se ha denominado “diálogo molecular” entre la bacteria y la planta.

El intercambio de señales químicas entre ambos simbiotes activa genes específicos en la leguminosa y en el rizobio. La infección se inicia con la emisión de señales de quimiotaxis de la planta hacia el *Rhizobium*. Los rizobios atraídos por los exudados excretados por las raíces de la leguminosa colonizan y proliferan en la rizosfera. Los exudados radicales contienen azúcares, aminoácidos y otros nutrientes, así como compuestos flavonoides (flavonas, isoflavonas, chalconas y flavononas) y no flavonoides (betaínas y ácidos aldónicos). Algunos de estos compuestos fenólicos son capaces de inducir la transcripción de un grupo de genes del rizobio implicados en la nodulación, los denominados genes de nodulación, genes *nod* (Sánchez *et al.*, 1991).

Los genes *nod* pueden ser genes comunes a todas las especies de rizobios como los genes *nodABC* o ser específicos del hospedador como los genes *nodPQH* o *nodFEL*, los cuales difieren según la especie del rizobio y determinan el rango del hospedador.

El gen *nodD*, es el único gen constitutivo y regula la transcripción de la expresión del resto de los genes *nod*. Los compuestos flavonoides excretados activan la proteína del rizobio NodD, la cual induce la transcripción de los genes de nodulación (Phillips *et al.*, 1995) y media la síntesis de los factores Nod. El mecanismo de traducción de la señal del factor Nod esta mediado por proteínas G acopladas a la activación de fosfoinositol y Ca<sup>2+</sup> como segundos mensajeros (Pingret, 1998). Este factor es un lipo-quitinoligosacarido compuesto por una cadena lineal de 3 a 5 moléculas de N-acetilglucosamina unidas con enlaces β 1-4, con un ácido graso en el extremo no reductor y diversos sustituyentes donde reside la especificidad de reconocimiento por el hospedador. Asimismo, induce unas respuestas tempranas en la leguminosa entre las que se encuentran cambios en la concentración intracelular de iones (Cardenas, 1999), reorganización del citoesqueleto (Harris *et al.*, 2003), despolarización de la membrana plasmática (Felle *et al.*, 1998), variaciones en el pH citosólico, divisiones de las células

corticales de la raíz mediante activación del ciclo celular (Kondorosi *et al.*, 1998) dando lugar al primordio nodular y una serie de cambios preparativos para la formación del cordón de infección (Lerouge *et al.*, 1990; Spaink, 1992). Además estos factores van a inducir la expresión génica de determinadas proteínas del nódulo denominadas nodulinas como las nodulinas tempranas ENOD12 y ENOD20 (Cullimore *et al.*, 2001).

Recientemente se han descrito dos genes que codifican las proteínas NORK (*NOdulation Receptor Kinase*) y SYMRK (*SYMBiosis Receptor-like Kinase*) que contienen un dominio extracelular con tres repeticiones ricas en leucina (LRR) a través del cual interaccionarían con el factor Nod, un dominio transmembrana y un dominio kinasa intracelular Ser/Thn que estaría implicado en la transducción de la señal de nodulación dentro de la célula (Endre *et al.*, 2002; Stracke *et al.*, 2002). No obstante, estas proteínas de membrana que parecen estar implicadas en el reconocimiento del factor Nod en varias leguminosas (*Medicago*, *Pisum* y *Lotus*), sólo lo harían indirectamente, existiendo un reconocimiento inicial que podría ser desempeñado por moléculas extracelulares secretadas como lectinas (Spaink, 2002).

En la infección, los rizobios contactan con la raíz a través del pelo radical induciendo la deformación y curvatura en forma de cayado de pastor. En este proceso se produce la alteración y degradación de los polisacáridos de la pared celular vegetal en un punto muy localizado (Martínez Molina y Olivares, 1982) y tiene lugar la formación de una estructura tubular de pared celular similar en composición a la pared celular vegetal y rodeada interiormente de membrana plásmática, el cordón de infección (Rae *et al.*, 1992; Gage *et al.*, 1996; Gage y Margolin, 2000; Gage, 2002).

Los distintos polisacáridos superficiales de los rizobios (exopolisacáridos,  $\beta$ -glucanos cíclicos, lipopolisacáridos y polisacáridos capsulares) están implicados en el inicio y el desarrollo del cordón de infección y en general, independientemente del momento de la infección en que intervengan parecen estar implicados en el retraso o inhibición de la respuesta de defensa de la planta que permitirá la colonización de la raíz (Djordjevic *et al.*, 1987; González *et al.*, 1998; Fraysse *et al.*, 2003). Además los genes *nin* de la planta están implicados en la formación de los pelos radicales y la iniciación del primordio, controlando el desarrollo de los nódulos simbióticos de la raíz (Schauser, 1999).

Los rizobios penetran por invaginación de la membrana plasmática, a través del cordón de infección, quedando inmersos en una matriz de naturaleza glicoproteica de origen bacteriano y vegetal. Al tiempo que se produce la infección, en el cortex de la raíz las células corticales se diferencian y comienzan a sufrir divisiones que darán lugar al primordio nodular, que al desarrollarse constituirá el nódulo.

Para facilitar la unión del rizobio a las células de la pared del pelo radical, el factor Nod media la activación de unas proteínas de la leguminosa, las lectinas producidas en los pelos de la raíz (van Rhijn *et al.*, 1998; Etzler *et al.*, 1999). Las lectinas median la especificidad de la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa (Hirst, 1999).

Las bacterias se liberan al citoplasma celular vegetal mediante un proceso que se asemeja a la endocitosis a través de una estructura característica denominada gota de infección, en este momento las bacterias se transforman en bacteroides. Y finalmente se rodean de una membrana de origen vegetal derivada de la membrana plasmática, la membrana peribacteroidal (MPB), membrana en íntimo contacto con el bacteroide (de Felipe *et al.*, 1997), diferenciado a partir de la transformación de la bacteria. La membrana peribacteroidal mantiene físicamente fuera del citoplasma a los bacteroides, evitando así la posible respuesta de defensa de la planta, además de jugar un papel fundamental en el intercambio metabólico entre el citoplasma celular y los bacteroides en la simbiosis.

Se constituye así el simbiosoma, unidad básica de fijación de nitrógeno, capaz de regular el transporte de metabolitos entre los simbiosomas, la planta proporciona azúcares (fuente de carbono y energía) al bacteroide y éste, a cambio, suministra a la planta nitrógeno en forma asimilable. El simbiosoma puede contener uno o más bacteroides, siendo esta una característica de cada simbiosis.

A partir de aquí el nódulo es efectivo, capaz de fijar  $N_2$  mediante la enzima nitrogenasa. De esta reducción resulta  $NH_4^+$ , el cual es asimilado por las células vegetales en forma de amidas principalmente asparagina y glutamina en los nódulos indeterminados, o de ureidos como la alantoína, el ácido alantoico y la citrulina en los nódulos determinados vía GS/GOGAT (glutamina sintetasa/glutamina 2-oxo-glutarato aminotransferasa), mientras el microsimbionte utiliza los fotosintatos que le suministra la planta a través de los haces vasculares.

Se han descrito dos tipos de nódulos en las leguminosas:

- Nódulos determinados: los cuales se originan de un meristemo que determina su crecimiento durante un periodo de tiempo limitado y cuyas etapas de desarrollo nodular están separadas en el tiempo (Nap y Bisseling, 1990). A este grupo pertenecen leguminosas de climas tropicales como *Glycine*, *Phaseolus*, *Vigna*.
- Nódulos indeterminados: son generalmente pleomórficos, de crecimiento continuo debido a que el meristemo apical mantiene su actividad de forma perenne. Y cuyas etapas de desarrollo del nódulo están separadas en el espacio y no en el tiempo (Nap y Bisseling, 1990). A lo largo del eje longitudinal del nódulo desde el ápice hasta su conexión a la raíz se distinguen cuatro zonas: zona meristemática (zona I); zona de preinfección o infección (zona II); zona ocupada por bacteroides

maduros y con fijación activa de nitrógeno (zona III); zona senescente e inactiva en la fijación (zona IV), la cual aparece en el envejecimiento del nódulo (Truchet *et al.*, 1989; Vasse *et al.*, 1990). La conexión a la raíz es estrecha, excepto en *Lupinus*. Es el tipo de nódulo que presentan las leguminosas de zonas templadas, *Pisum*, *Vicia*, *Trifolium* y *Medicago*.

### 3. Fisiología del nódulo

A partir de la diferenciación de la bacteria en bacteroide en el interior de las células del nódulo, el bacteroide adquiere la capacidad de reducir el nitrógeno atmosférico a través del complejo enzimático nitrogenasa, cuyas propiedades son constantes en todos los microorganismos fijadores de N<sub>2</sub> estudiados.

La enzima consta de dos proteínas: el componente I y II. El componente I: molibdoferredoxina (Mo Fe), formado por un tetrámero  $\alpha_2\beta_2$ , de 180 a 235 kDa, dependiendo de la especie, asociado a un cofactor con Fe y molibdeno (Fe Moco). Esta proteína está codificada por los genes *nifD* y *nifK* y es responsable de la reducción del sustrato N<sub>2</sub> molecular a amoníaco, utilizando los electrones donados por el componente II. El componente II: azoferredoxina, está formada por un homodímero  $\delta_2$ , de 30 a 72 kDa, dependiendo del organismo, cuya función es la transferencia de e<sup>-</sup> al componente I, y por último al nitrógeno. Esta proteína es codificada por los genes *nifH*.

Estos componentes efectúan la reacción de reducción:



Esta fijación enzimática de N<sub>2</sub> es un proceso con un elevado coste energético, que requiere el acoplamiento de un sistema eficiente de generación de ATP, como la fosforilación oxidativa. En *Rhizobia*, del 30 al 60% de la energía suministrada para la nitrogenasa se pierde como H<sub>2</sub>, disminuyendo la eficiencia de la fijación de nitrógeno. Algunos rizobios, sin embargo, contienen una hidrogenasa codificada por los genes *hup*, enzima que es capaz de reciclar el H<sub>2</sub> formado por la nitrogenasa, mejorando la fijación de nitrógeno en un uso más eficiente de la enzima (Marschner, 1995). Por otra parte la respiración bacteroidal suministra ATP para el proceso de fijación, pero el enzima nitrogenasa es extremadamente lábil al O<sub>2</sub>. Por ello la concentración de O<sub>2</sub> en las proximidades de la enzima debe controlarse mediante mecanismos adecuados, adoptando diversas estrategias para crear un ambiente microaeróbico, de forma que el O<sub>2</sub> no llegue a inactivar a la nitrogenasa (Becana y Rodríguez-Barrueco, 1989).

De esta forma los nódulos de las leguminosas han desarrollado mecanismos de resistencia variable a la difusión de  $O_2$ , mediante una barrera de resistencia a la difusión de  $O_2$ , una elevada tasa de respiración bacteroidal y un transportador específico de alta afinidad por el  $O_2$ , la leghemoglobina.

El primer mecanismo: **la barrera de resistencia a la difusión del oxígeno** está constituida por 2 a 4 capas compactas de células situadas en la corteza media. Esta barrera presenta adaptaciones, variando su forma y tamaño, al fluctuar las concentraciones de  $O_2$  externa, cuando los nódulos están sometidos a distintas situaciones de estrés, como la aplicación de nitrato (de Lorenzo *et al.*, 1993), alta salinidad (Fernández-Pascual *et al.*, 1996), bajas presiones de oxígeno (Guasch *et al.*, 2001), altas concentraciones de Cadmio (Carpena *et al.*, 2003) y sequía (Verdoy *et al.*, 2004). Ante tales estreses, la funcionalidad de la barrera reduciría la disponibilidad de  $O_2$  para la respiración bacteroidal, y con ella, la respiración asociada a la nitrogenasa y la fijación simbiótica de nitrógeno. La adaptabilidad en respuesta a estas situaciones provoca la oclusión de los espacios intercelulares de algunas de las capas celulares que forman la barrera, por una matriz glicoproteica que es reconocida por los anticuerpos monoclonales MAC 236 y MAC 265. Estas glicoproteínas contribuyen a una regulación coordinada de la difusión de  $O_2$  según las necesidades del nódulo (de Lorenzo *et al.*, 1998), junto con la intervención de la membrana plasmática y la pared celular (Layzel, 1998).

Una vez el oxígeno ha entrado en la corteza, es la **leghemoglobina** la que facilita el transporte del oxígeno a los bacteroides y controla la concentración de  $O_2$  libre.

La leghemoglobina es una hemoproteína monomérica que está codificada por una familia multigénica. Se localiza en el citoplasma de las células infectadas (Vivo *et al.*, 1989), constituyendo el 25 % del contenido proteico total además de conferir el color rosado de los nódulos maduros. Funcionalmente, facilita la difusión de  $O_2$  a través del citosol de las células infectadas del nódulo hasta la membrana de los simbiosomas y estructuralmente, está constituida por un grupo prostético hemo (protoporfirina IX) y un único polipéptido (globina) de 16 kDa de masa molecular. En condiciones fisiológicas el grupo hemo es sintetizado por el bacteroide y la globina (apoproteína) es sintetizada por los ribosomas de las células infectadas de la planta, en respuesta a la infección por la bacteria (Marschner, 1995), para finalmente ambos, ensamblarse en el citoplasma vegetal (Becana, 1995). Sin embargo, en la zona infectada de soja y guisante, se han localizado un alto número de transcritos de las distintas enzimas que participan en la ruta de síntesis del grupo hemo, lo que evidenciaría al mismo tiempo una síntesis en plantas (Santana *et al.*, 1998). Además esta hemoproteína es la más importante de las nodulinas tardías expresadas al mismo tiempo que la fijación de  $N_2$ , aunque, también se ha

detectado expresión de genes de leghemoglobina en estadios tempranos en *Vicia sativa*, como pone de manifiesto la identificación de un gen *lb* (*VsLb1*) expresado con la aplicación de factores Nod (Heidstra, 1997).

Los numerosos componentes que presenta la leghemoglobina difieren ligeramente entre sí en su secuencia de aminoácidos, espectros y afinidades por el O<sub>2</sub> (Nap y Bisseling, 1990), aunque no se les ha atribuido funciones específicas a éstos, si se especula que intervienen en el mantenimiento de un aporte óptimo de O<sub>2</sub> y en la adaptación a distintas condiciones ambientales (Becana y Sprent, 1989; Hunt y Layzell, 1993; Sato *et al.*, 2001). En *Glicine max* existen 4 componentes (Lba y Lbcs), de los cuales los Lbcs (Lbc1, Lbc2 y Lbc3) tienen una mayor expresión en los estadios tempranos del crecimiento del nódulo, mientras el componente Lba incrementa con el desarrollo nodular (Sato *et al.*, 2001). La expresión secuencial de los 4 genes *lb* existentes en *Glicine max* comienza con la activación del gen *Gmlbc3* mediante la CPP1, proteína de unión al ADN, la cual lo activa al interactuar con el promotor de dicho gen (Cvitanich *et al.*, 2000).

La estructura y su implicación funcional en las hemoglobinas de plantas y animales, se ha evaluado recientemente, demostrando que la estructura de su grupo prostético hemo es la que confiere la cinética necesaria y afinidad constante por el O<sub>2</sub> (Kundu *et al.*, 2003). En este estudio se describe la elevada similitud estructural con la leghemoglobina de algunas de ellas, como la mioglobina. Sin embargo, un único cambio de los residuos aminoacídicos en la posición F7 (Val) del grupo hemo proximal, implicaría distintos mecanismos de regulación para la unión del oxígeno (Hargrove *et al.*, 1997; Kundu *et al.*, 2002) y en consecuencia se produciría un aumento en la afinidad por el O<sub>2</sub>. Esto demostraría una de las posibles causas de la elevada afinidad por el oxígeno que tiene el grupo hemo de la leghemoglobina (Kundu *et al.*, 2003), diez veces más que la cadena  $\beta$  de la hemoglobina humana.

Existe otro tipo de hemoglobinas no simbióticas identificadas desde Briofitos a Angiospermas, y que posiblemente estén presentes en todas las plantas (Dordas *et al.*, 2003), aunque no en tan alta concentración como las simbióticas. El último tipo de hemoglobinas de plantas descubierto han sido las hemoglobinas 2-on-2 que presentan características estructurales comunes con las hemoglobinas bacterianas. Dos genes de 2-on-2 hemoglobina, de *Arabidopsis thaliana* (*glb3*) y de *Medicago truncatula*, evidencian la expresión de las hemoglobinas 2-on-2 a lo largo de las diferentes especies de plantas (Watts *et al.*, 2001; Fedorova *et al.*, 2002). Experimentos recientes en nódulos de *Vicia faba* han relacionado la regulación génica de la leghemoglobina en leguminosas simbióticas con otras plantas leguminosas y no leguminosas micorrizadas con el hongo *Glomus*. Así el promotor del gen *VfLb29* en *Vicia faba* no sólo se activa en las células



infectadas de nódulos simbióticos sino también en raíces micorrizadas de leguminosas y no leguminosas como *Nicotiana tabacum* (Vieweg *et al.*, 2004).

Por último el tercer mecanismo de protección al O<sub>2</sub> es **la respiración de los bacteroides** para obtener el ATP necesario para el funcionamiento de la nitrogenasa. Sin embargo, a una concentración baja de O<sub>2</sub> es necesario que la respiración bacteroidal sea eficiente; esto se consigue mediante la expresión de una isoforma enzimática de citocromo oxidasa de elevada afinidad por el O<sub>2</sub>.

#### 4. Simbiosis *Lupinus* sp.- *Bradyrhizobium* sp. (*Lupinus*)

La especie *Lupinus albus* pertenece a la familia *Leguminosae*, subfamilia *Papilionodeae*, tribu *Genisteeae*, subtribu *Lupininae* y género *Lupinus*. Es una planta de porte arbustivo, anual o perenne de hojas digitadas con 5 a 7 folíolos e inflorescencias terminales (fig. 1). El lupino es considerado una de las leguminosas de mayor potencial debido al alto contenido proteico de sus semillas (30-50%) y a su efecto positivo sobre la fertilidad del suelo (Vance, 2001). Posee una serie de características que le confieren independencia con respecto al resto de leguminosas grano cultivadas en climas templados, tales como la habilidad para solubilizar y absorber elementos del suelo gracias a su sistema radical extensivo, la supervivencia en suelos de bajo pH, de escasez de agua, de pobreza en nutrientes y de acidez alta. Con respecto a la adquisición de nutrientes cabe destacar la ausencia de micorrización y la absorción facilitada de fósforo en suelos de bajo contenido en este elemento, gracias a un sistema de raíces proteoides. Estas raíces de pequeño tamaño y crecimiento limitado son capaces de extraer el fósforo gracias a una alta densidad de pelos radicales (Gardner *et al.*, 1982). De las especies de *Lupinus*, *albus* es la mejor adaptada en suelos de acidez alta y pobreza en nutrientes, y la variedad Multolupa la de mayor resistencia a bajas temperaturas, hasta -6°C. Investigaciones llevadas a cabo en nuestro departamento han demostrado que *Lupinus albus* es tolerante a ciertos estreses abióticos ambientales (de Lorenzo *et al.*, 1993; Fernández-Pascual *et al.*, 1996; Guasch *et al.*, 2001) y que puede acumular en sus raíces metales como Cd, Hg, Pb, Zn y Cr (Carpena *et al.*, 2001; Zornoza *et al.*, 2002), lo que le convierte en un potencial fitorremediador de sistemas contaminados (Pastor *et al.*, 2003; Carpena *et al.*, 2003).

*Lupinus* es nodulado por rizobios de crecimiento lento del género *Bradyrhizobium*, y se encuadra dentro de las leguminosas con un tipo de nódulo indeterminado. Sin embargo no muestra la mayoría de las características de este tipo (meristemo apical persistente y forma cilíndrica), por lo cual se le ha clasificado en un subgrupo llamado nódulo lupinoide (fig. 2A; Bergensen, 1982; Corby *et al.*, 1983), caracterizado por el crecimiento continuo alrededor de la raíz hasta llegar a rodearla completamente, así

como de adoptar formas agregadas o por el contrario presentarse unitariamente alrededor de la raíz.



Figura 1: Planta de *Lupinus albus*.

La vía de entrada de *Bradyrhizobium* y la infección de las raíces de *Lupinus* ha sido estudiada recientemente en nuestro departamento, demostrándose que se trata de una infección propia y característica de *Lupinus albus*. La infección muestra mayor similitud con el modelo de infección de *Arachis hypogaea* que con la típica de los nódulos indeterminados a través del cordón de infección. Por otra parte, la vía de entrada bacteriana se realiza entre la parte basal del pelo radical y las células epidérmicas contiguas, y la invasión y posterior liberación de los rizobios en las células corticales ocurre en zonas alteradas de la pared celular (González-Sama, 2003).

En la estructura nodular madura de *Lupinus* se diferencian claramente dos regiones: la corteza y la zona central infectada (fig. 2B; de Lorenzo, 1992). En la corteza se observan tres zonas perfectamente visualizadas: corteza externa (zona 1), media o parénquima nodular (zona 2) e interna (zona 3). La corteza externa está integrada por varias capas de células con grandes espacios intercelulares y sin engrosamiento en sus paredes, es la también llamada zona 1. Debajo se halla una zona formada por 2 ó 3 capas de células de mayor tamaño, con paredes engrosadas en la zona que rodea los espacios intercelulares. El área de contacto entre células carece de engrosamiento. A

esta zona se la llama corteza media o zona 2. En esta zona parece estar ubicada la barrera de resistencia a la difusión de oxígeno, donde se ha localizado la glicoproteína implicada en su regulación (de Lorenzo *et al.*, 1993; Iannetta *et al.*, 1993) reconocida por los anticuerpos monoclonales MAC 236 y MAC 265 según VandenBosch *et al.*, 1989. Seguidamente se encuentran 2 ó 3 capas de células de menor tamaño, muy empaquetadas con reducidos espacios intercelulares, es la zona interna de la corteza o zona 3, donde se sitúan los haces vasculares. El oxígeno y demás gases que intervienen en el proceso de fijación llegan hasta los bacteroides mediante difusión, a través de los espacios intercelulares de la corteza y la zona infectada. Los espacios intercelulares están conectados entre sí formando la denominada red de espacios aéreos (Witty, 1986; fig. 3), la cual representa una vía continua ocupada mayoritariamente por gases y por tanto muy implicada en la difusión de  $O_2$ . Por último la zona central del nódulo, rodeada por la corteza está integrada por células infectadas, repletas de un gran número de bacteroides, en donde tiene lugar la fijación de nitrógeno, bacteroides fruto de la simbiosis con *Bradyrhizobium* sp. (*Lupinus*). Los simbiosomas del nódulo de *Lupinus albus* se caracterizan por contener un único bacteroide.

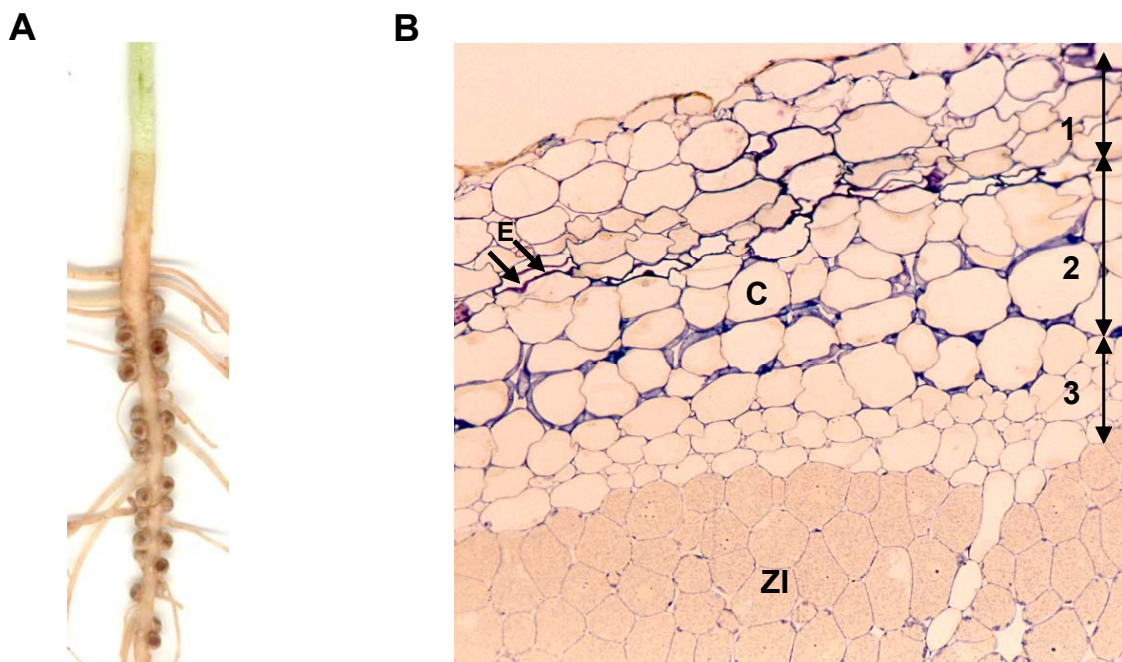
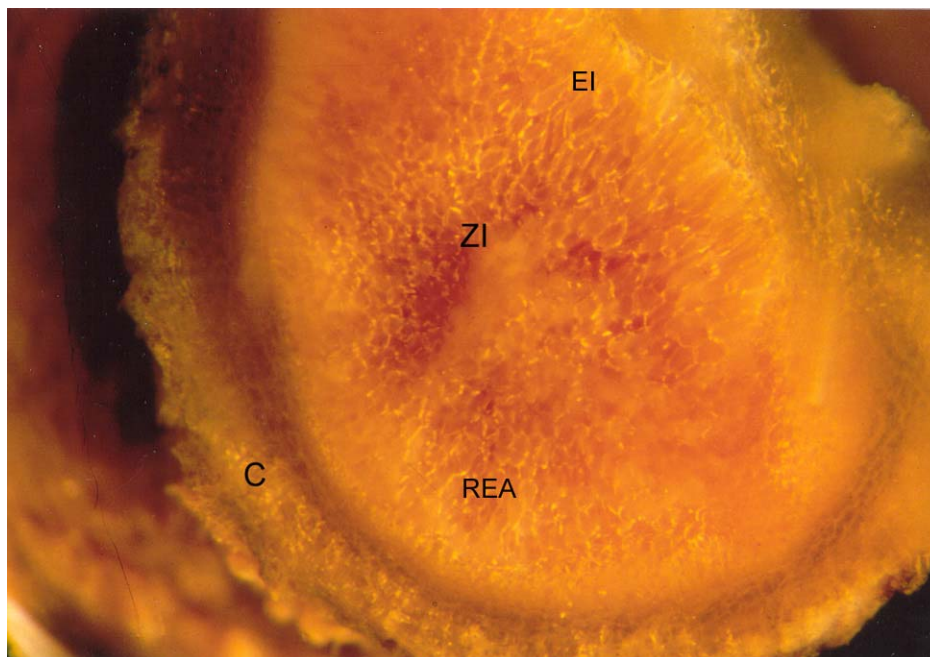


Figura 2: A) Raíz nodulada de *Lupinus albus*. B) Sección transversal de nódulo de *Lupinus albus* cv. Multolupa. C: corteza; ZI: zona infectada; E: endodermis; 1: corteza externa; 2: corteza media (parénquima nodular); 3: corteza interna.



*Figura 3: Sección transversal del nódulo de Lupinus albus donde se observan los espacios aéreos mediante microscopía óptica de campo oscuro y luz polarizada. C: corteza; EI: espacio intercelular; ZI: zona infectada; REA: red de espacios aéreos que representa el conjunto de espacios intercelulares del nódulo.*

## 5. Metabolismo del carbono en nódulos

El metabolismo del carbono juega un papel muy importante en la regulación de la fijación biológica de nitrógeno (FBN) que tiene lugar en los nódulos de las leguminosas.

Los nódulos necesitan carbohidratos para su mantenimiento y desarrollo, utilizando éstos como fuente de energía y esqueletos de carbono para la fijación, la incorporación del nitrógeno fijado y la exportación de los compuestos nitrogenados (Gordon, 1995).

**La sacarosa** (Sac), como principal componente carbonado, es sintetizada en las hojas y transportada por el floema hasta los nódulos, así como a otros sumideros de la plantas. Una vez llega al cortex nodular difunde dentro de las células infectadas para ser metabolizada. Los productos del catabolismo de la Sac (generalmente ácido málico; Udvardi y Day, 1997) son entonces utilizados por los bacteroides para la fijación de  $N_2$  (Vance y Heichel, 1991; Gordon, 1995) y este  $N_2$  fijado es exportado al citosol de la célula infectada como amonio, donde se incorpora en forma de glutamato, dando origen a aspartato y asparagina o ureidos en nódulos determinados.

La sacarosa es un disacárido no reductor formado por la unión  $\alpha(1-2)-\beta$  de  $\alpha$ -D-glucopiranososa y  $\beta$ -D-fructofuranosa. Esta unión puede ser hidrolizada por la enzima **sacarosa sintasa** (SS) o por la invertasa alcalina (AI), y en la ruta glucolítica proporcionar la energía y los esqueletos carbonados para la respiración bacteroidal y asimilación de

amonio. Desde el punto de vista energético la hidrólisis de la Sac vía sintasa es más favorable, ya que implica el consumo de una molécula de ATP con la producción de pirofosfato (Plaxton, 1996).

La SS es una enzima homotetramérica, con una masa molecular monomérica de 92 kDa (Morell y Copeland, 1985; Kuster *et al.*, 1993). Cataliza la hidrólisis de sacarosa mediante la ruptura del enlace glicosídico, con la formación de UDP-glucosa para la formación de azúcares, nucleótidos y polisacáridos, como el almidón y la celulosa. Esta enzima localizada en la región central de nódulos de soja (Gordon y James, 1997), presenta niveles altos de actividad en los nódulos fijadores de todas las leguminosas estudiadas. Además se ha demostrado que es esencial como punto de regulación en el metabolismo nodular para el desarrollo y funcionamiento del nódulo, ya que mutantes con sólo un 10% de actividad enzimática son incapaces de fijar nitrógeno (Gordon *et al.*, 1999), es más, hay una estrecha relación entre la inhibición de la actividad sacarosa sintasa y la disminución de la fijación de nitrógeno en respuesta a diferentes estreses: sequía (Arrese-Igor *et al.*, 1999; González *et al.*, 2001; Cabrerizo *et al.*, 2001), nitrato (Gordon *et al.*, 1997), salinidad (Fernández-Pascual *et al.*, 1996; Gordon *et al.*, 1997) y oscuridad (Gordon *et al.*, 1993). En contraste, en otros estudios no se implica la actividad SS en la regulación de la función nodular (Déjardin *et al.*, 1998; González *et al.*, 2001; Gordon *et al.*, 2002).

La actividad enzimática SS además de estar regulada via transcripcional (Winter y Hunber, 2000; Geigenberger, 2003), puede sufrir modificaciones post-transcripcionales por fosforilación-Serina, en nódulos de soja (Zhang y Chollet, 1997; Komina *et al.*, 2002), diferentes órganos de maíz (Subbaiah y Sachs, 2001), en plantas de tomate (Anguenot *et al.*, 1999) y de algodón (Haigler *et al.*, 2001). En esta fosforilación se ha visto la implicación de proteínas Kinasas dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$ , de las cuales algunas han sido recientemente purificadas y caracterizadas (Loog *et al.*, 2000; Asano *et al.*, 2002). Algunos autores sugieren que el estado de fosforilación de la proteína juega un importante papel fisiológico al provocar cambios en la asociación a membrana de la enzima (Amor *et al.*, 1995, Winter *et al.*, 1997). Así se ha demostrado que el estado de fosforilación de la SS citosólica, la posibilita para asociarse con el citoesqueleto a través de filamentos de actina (Winter *et al.*, 1998; 2000; Subbaiah y Sachs, 2001), sin embargo otros autores no ven establecida la relación del estado de fosforilación reversible con la distribución intracelular de la enzima entre el citoplasma y la membrana plasmática (Komina *et al.*, 2002).

En monocotiledoneas y dicotiledoneas se conocen dos genes que codifican para SS (*sus1* y *sus2*). En leguminosas Barratt *et al.*, 2001 describieron diferentes isoformas de SS en guisante (*Pisum*). En judía (*Phaseolus vulgaris*), ha sido descrita la existencia

de al menos dos genes: *PvSSn*, expresado fundamentalmente en nódulos, el cual depende de la disponibilidad de carbono existente y *PvSS* expresado en todos los tejidos (Silvente *et al.*, 2003). Recientemente, la familia multigénica (*AtSUS*) de la enzima SS, ha sido descrita en *Arabidopsis*, mediante una serie de tratamientos que han hecho posible la caracterización de los seis grupos que la constituyen. Los genes *AtSUS* mostraron diferentes patrones de expresión dependiendo del órgano de la planta y del tipo de estrés aplicado (Baud *et al.*, 2004).

En los nódulos, esta enzima puede relacionarse con cuatro funciones: 1. Actuación en el paso inicial del metabolismo carbonado produciendo hexosas que por distintas vías oxidativas producen la energía y el poder reductor utilizado por la nitrogenasa (Winter *et al.*, 1997). 2. Los productos de la hidrólisis proporcionan substratos carbonados que participan en la síntesis de aminoácidos a expensas del amonio excretado por los bacteroides. 3. La UDP-glucosa puede integrarse en la síntesis de polisacáridos de la pared celular, necesaria en los momentos iniciales de la simbiosis y de otros azúcares (Kleczkowski, 1996; Pozueta-Romero *et al.*, 1999). 4. Este mismo producto de la hidrólisis puede ser convertido en ADP-glucosa necesario para la síntesis de almidón que se almacena en los amiloplastos de las células infectadas y no infectadas.

Las hexosas formadas por la SS son hidrolizadas en la ruta de la glucolisis para obtener fosfoenolpiruvato (PEP). La fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPc) cataliza la combinación del CO<sub>2</sub> respiratorio como HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> con PEP para producir oxalacetato, el cual es convertido en malato por la enzima malato deshidrogenasa (MDH). Este malato puede ser usado como fuente de carbono y energía para el consumo bacteroidal o entrar en la mitocondria y ser oxidado en el ciclo de los ácidos dicarboxílicos y contribuir a la asimilación de amonio a través del ciclo GS/GOGAT. El transporte de malato es a través de la MPB por un transportador de ácidos carboxílicos con una alta afinidad por este (Udvardi y Day, 1997).

Los ácidos dicarboxílicos, especialmente el malato, son la mayor fuente de energía que sostiene la fijación de nitrógeno en bacteroides. Fosfoenolpiruvato carboxilasa, malato deshidrogenasa y aspartato aminotransferasa (AST) operan coordinadamente en el citosol nodular para producir oxalacetato, ácido málico y aspartato y su actividad está asociada con la efectividad de la fijación de nitrógeno.

La enzima **PEPc** (EC 4.1.1.31) está distribuida en la mayoría de las plantas, algas verdes y microorganismos, y ausente en sistemas animales (Chollet *et al.*, 1996). Cataliza un proceso irreversible de carboxilación de PEP para producir oxalacetato y fósforo inorgánico, dependiente de Mg<sup>2+</sup>. La forma activa de la enzima es un homotetramero con una masa molecular monomérica de 100 kDa. Se localiza en el citoplasma celular, siendo muy abundante en el tejido nodular, reciclando el CO<sub>2</sub> respirado y aumentando la eficacia



de la simbiosis. Sin embargo, son poco conocidos los mecanismos implicados en la expresión génica de PEPc durante el establecimiento y mantenimiento de la simbiosis. Pathirana *et al.*, 1992 observaron un incremento de la actividad enzimática, contenido en proteína y del número de transcritos de PEPc, del orden de 10 a 15 veces mayor durante el desarrollo nodular que en las raíces y hojas, lo que relacionaría la expresión del gen en el inicio y desarrollo del nódulo con el inicio y mantenimiento de la simbiosis. Asimismo, en nódulos maduros de soja fueron encontrados altos niveles de expresión de transcritos del gen de PEPc mediante hibridación *in situ*, mientras en los nódulos jóvenes la acumulación de transcritos fue baja (Kavroulakis *et al.*, 2000).

En diversas plantas se ha estudiado las múltiples isoformas de PEPc, asociándolas con diferentes rutas metabólicas. En nódulos de lupino se han separado dos isoformas PEPc I y PEPc II, y otra forma de la enzima en raíz PEPc III. Del estudio comparativo de las propiedades cinéticas y bioquímicas de la enzima se dedujo que la PEPc I estaba estrechamente relacionada con la fijación de nitrógeno (Marczewski, 1989). Recientemente se ha caracterizados el ADNc de dos isoformas de PEPc de *Lotus japonicum*, un gen codifica la forma activada en el nódulo y el otro esta expresado en las raíces y yemas en bajos niveles (Nakagawa *et al.*, 2003).

Las PEPc son enzimas alostéricas reguladas por fosforilación/desfosforilación en una única serina localizada en la región N-terminal de la proteína. Esta fosforilación es llevada a cabo por una proteína kinasa de bajo peso molecular (32 kDa) altamente específica (PEPc-PK) y que es regulada por síntesis proteica a través de una cascada de traducción de señales dependiente de la luz en plantas  $C_4$  (Coursol *et al.*, 2000) y de ciclos circadianos en plantas CAM (Metabolismo ácido de las crasuláceas; Nimmo, 2000). La actividad de la enzima PEPc se inhibe alostericamente por aspartato, malato, glucosa, piruvato y 2-oxoglutarato, y se activa por glucosa-6P y glicina. Las enzimas fosforiladas son más activas y mucho menos sensibles al malato, un efector negativo, mientras las formas desfosforiladas son menos activas y menos sensibles a glucosa 6P, un efector positivo (Chollet *et al.*, 1996; Vidal y Chollet, 1997; Nimmo, 2000).

El mecanismo de regulación de la actividad ha sido estudiado ampliamente en plantas  $C_4$  y CAM, por su importancia fisiológica. En nódulos de legumbres la enzima está sujeta a un ciclo regulador seril-fosforilación/seril-desfosforilación, como el ya establecido en isoformas fotosintéticas en plantas  $C_4$  y CAM (Chollet *et al.*, 1995). En la regulación la PEPc-PK es la responsable de la activación e inhibición de la actividad enzimática, aunque el mecanismo aún no esta muy clarificado (Zhang y Chollet, 1997).

Estudios previos han demostrado que la PEPc, coordina el metabolismo de carbono y nitrógeno (Champigny y Foyer, 1992; Van Quy y Champigny, 1992; Scheible *et al.*, 2000). Al estar involucrada en distintos aspectos de la fijación de nitrógeno en

nódulos de leguminosas, entre los que se incluyen: 1. Síntesis de ácidos orgánicos, málico y succínico, utilizados como sustrato respiratorio de los bacteroides para la actividad nitrogenasa. 2. Suministro de esqueletos carbonados para la asimilación de amonio y transporte de nitrógeno fijado. 3. Los ácidos orgánicos producidos pueden mantener el balance intracelular de pH y equilibrar el transporte de iones. 4. Reciclar el CO<sub>2</sub> generado en la respiración, contribuyendo a la economía de carbono en los nódulos.

La PEPc se ha asociado desde las primeras investigaciones con la actividad nitrogenasa, esto se verificó en la correlación entre la actividad de la PEPc en nódulos de *Lupinus* y la capacidad para fijar N<sub>2</sub> (Vance *et al.*, 1985; Lang *et al.*, 1993). Así se vio que tratamientos que inhiben la actividad de nitrógeno también afectan a la actividad de la enzima (Van y Heichel, 1991; Lang, 1991). Además la adaptación a cambios ambientales o condiciones de estrés (Ju *et al.*, 1997; Foyer *et al.*, 1998; Gouia *et al.*, 2003) incrementaron la actividad enzimática, posiblemente debido a una síntesis *de novo* o a una activación de la enzima, aunque no son bien conocidos los mecanismos envueltos sobre la actividad enzimática. González *et al.*, 2003 en el análisis del patrón de expresión del gen *Ppc1*, recientemente descrito (González *et al.*, 2002), que codifica para PEPc en maíz, sugieren la implicación de la PEPc en la economía de carbono de la planta. Sin embargo, el alto nivel e inducción de la expresión del gen de PEPc bajo estrés abiótico afectando al balance hídrico demuestra el importante papel que la PEPc juega en la adaptación de la planta de maíz a cambios ambientales.

La enzima **malato deshidrogenasa** (EC 1.1.1.37) cataliza la reducción reversible de oxalacetato a malato. Esta enzima es importante en varias rutas metabólicas, y en plantas superiores contiene múltiples isoformas que difieren en la especificidad coenzimática y en la localización subcelular.

Ratajczak *et al.*, 1989 en estudios inmunológicos del lupino amarillo, utilizando una mezcla de anticuerpos, demostraron que los nódulos contenían isoformas diferentes de MDH que proporcionaban la fuente de carbono y el poder reductor para los bacteroides. En nódulos efectivos de guisante se observó que existía una única forma activa de MDH (Haaker *et al.*, 1995), mientras en alfalfa se han clonado y caracterizado ADNc que codifican para cinco formas de MDH. Una MDH citosólica y las otras las llamadas formas activas en nódulos (MDHne), de mayor expresión nodular en relación con el resto de los tejidos, además de ser las responsables de las altas concentraciones de malato observadas en el nódulo (Miller *et al.*, 1998).

La MDH citoplásmica tiene un papel importante en el complejo metabolismo de los nódulos radicales, en donde la degradación anaeróbica de la glucosa puede conectarse con la fermentación del malato (Garnczarska y Ratajczak, 1996) cuyas funciones son: 1. Suministrar sustratos respiratorios para el bacteroide. 2. Producir los esqueletos



carbonados, en forma de ácido oxalacético, para la síntesis de aminoácidos (asparagina). 3. El malato forma parte de la lanzadera malato-aspartato que transporta los equivalentes de reducción del citoplasma al bacteroide. 4. El malato actúa como sustrato respiratorio para la mitocondria del nódulo.

Se ha confirmado la presencia de tres formas de MDH en nódulos: citosólica (Henson y Collins, 1984), bacteroidal (Garnczarska y Ratajczak, 1999) y mitocondrial (Glenn *et al.*, 1984; Waters *et al.*, 1985). Esta última funciona en la dirección de la oxidación de malato hacia la síntesis de AOA y el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (Bowman e Ikuma, 1976).

La enzima **aspartato aminotransferasa** (EC 2.6.1.1) regula el flujo de carbono y nitrógeno entre ácidos orgánicos y aminoácidos (Snapp y Vance, 1986), catalizando la formación de cetoglutarato y aspartato, y en la vía reversible transfiriendo un grupo amino desde glutamato a oxalacetato. Se le atribuyen las siguientes funciones: 1. Catabolismo y biosíntesis de aspartato (Bryan, 1980). 2. Conversión de los intermediarios del ciclo de los ácidos tricarboxílicos a aminoácidos (Ryan y Fottrell, 1974) y 3. Asimilación del N<sub>2</sub> fijado en asparagina en nódulos exportadores de amidas (Farnham *et al.*, 1990).

La AST es una enzima dimérica con una masa molecular monomérica de 40 kDa. Se han descrito dos isoformas de AST (AST-1 y AST-2) en leguminosas, como soja (Ryan *et al.*, 1972), lupino (Reynolds y Farnden, 1979; Reynolds *et al.*, 1992; Martins *et al.*, 2002) y en nódulos de alfalfa. Éstas difieren en sus propiedades cinéticas y en las características de su expresión a lo largo del desarrollo nodular. La forma plastídica AST, es la responsable de la actividad localizada del nódulo (Vance *et al.*, 1994). Las ASTs están presentes en todos los organismos normalmente como múltiples isoenzimas, localizadas en los tejidos u orgánulos específicos. Las isoenzimas AST individualmente tienen respuestas diferentes según los componentes de C y N y las condiciones ambientales, lo que sugiere que son específicas y sus funciones no son solapantes (Taniguchi *et al.*, 1995; Schultz *et al.*, 1998).

En lupino se ha detectado actividad AST en citosol, mitocondrias, plastidios y bacteroides (Reynolds *et al.*, 1988; Lang, 1990). Aunque esta claro el papel que la AST juega en la formación de aspartato necesario para la síntesis de asparagina, se ha indicado que las distintas formas de AST del nódulo forman parte del mecanismo que aporta oxalacetato al bacteroide (Ryan *et al.*, 1972).

Los clones de ADNc y genómicos que codifican para AST han sido aislados de leguminosas como alfalfa (Gantt *et al.*, 1992; Gregerson *et al.*, 1993, 1994; Udvardi y Kahn, 1991), soja (Wadsworth *et al.*, 1993, 1994) y lupino (Reynolds *et al.*, 1992; Winifield *et al.*, 1994). Y recientemente ha sido aislado y descrito un clon de ADNc de judía (*Phaseolus vulgaris*). El análisis comparativo de su secuencia reveló una elevada

identidad con la isoforma AST-2, codificada por un gen unicopia. Su expresión está activada en el nódulo cuando incrementa la síntesis de amidas e inhibida con la acumulación de ureidos, lo que implica a la AST-2 en el mecanismo de síntesis de compuestos nitrogenados en nódulos de judía (Silvente *et al.*, 2003).

## 6. Metabolismo proteico en condiciones de estrés

Las plantas, frente a los diversos estreses abióticos deben adaptarse para sobrevivir. La síntesis de nuevas proteínas, desde el punto de vista de la función, es una respuesta a estos estreses y puede tener lugar en diferentes orgánulos subcelulares. A través de la síntesis de las llamadas *stress proteins* se producen alteraciones en el metabolismo proteico como consecuencia de la activación o inhibición de sus genes. Entre las principales proteínas de estrés relacionadas con estreses osmóticos (hídricos y salinos) se encuentran las acuaporinas.

### 6.1. Acuaporinas en simbiosis, porinas

Las acuaporinas forman parte de las proteínas intrínsecas de membrana (MIP). Son proteínas que median en el flujo de agua, solutos o ambos (Agre *et al.*, 1998) a través de las membranas celulares siguiendo gradientes de presión osmótica o hidrostática en numerosas plantas y también en muchos otros organismos (Chrispeels y Maurel, 1994; Kirch *et al.*, 2000; Tyerman *et al.*, 2002). A lo largo del desarrollo del nódulo, durante la formación del simbiosoma, el huésped codifica proteínas específicas del nódulo que son transportadas a la membrana del simbiosoma. Entre éstas se encuentra la proteína integral de membrana, nodulina 26 (NOD26, Fortin *et al.*, 1987) que constituye entre el 10-15% del total de las proteínas de membrana del simbiosoma. NOD 26 es una acuaporina expresada en la membrana peribacteroidal en nódulos de soja, que forma parte de la subfamilia de las MIP, las cuales juegan un importante papel en la osmoregulación citosólica, mantenimiento de la turgencia celular, transporte hídrico intracelular y extracelular y homeostasis hídrica en plantas (Tyerman *et al.*, 1999). La molécula de acuaporina es una proteína integral de membrana con seis dominios transmembrana  $\alpha$ -hélice y dos loops extracelulares. Algunos genes de acuaporinas tienen una expresión constitutiva basal, mientras que otros se inducen o reprimen transcripcionalmente bajo diferentes condiciones ambientales o por adición de hormonas como ABA (Suga *et al.*, 2002). El papel de las acuaporinas en plantas en el transporte de agua a través de membranas ha sido demostrado mediante la expresión en oocitos de *Xenopus laevis*, revelando que algunas acuaporinas pueden transportar otras pequeñas moléculas, como glicerol, solutos e iones (Quigley *et al.*, 2002; Tyerman *et al.*, 2002). Su expresión y actividad parece estar regulada por fosforilación en respuesta a la

disponibilidad de agua (Tyerman *et al.*, 2002), y puede estar afectada por el pH,  $pCa$ , presión osmótica y salinidad, metales pesados, temperatura, privación de nutrientes o anoxia y estrés oxidativo.

En nódulos de leguminosas *Pisum sativum* y de *Lotus japonicum*, recientemente se han localizado porinas VDAC (canales aniónicos dependientes de voltaje) en la membrana peribacteroidal. Estas porinas monoméricas forman canales para el transporte de metabolitos en la membrana externa de la mitocondria, y posiblemente juegan un papel estratégico en la membrana peribacteroidal controlando el intercambio de nutrientes entre la planta y el bacteroide en los nódulos de raíz de las leguminosas (Saalbach *et al.*, 2002; Wienkoop y Saalbach, 2003; Wandrey *et al.*, 2004).

Las porinas son un grupo muy diverso de proteínas de membrana externa, localizadas en la pared celular de bacterias Gram negativas (Delcour, 2002; fig. 4) y Gram positivas (Riess *et al.*, 2001). Asimismo se han localizado en la membrana de mitocondrias, peroxisomas de eucariontes (Benz, 1994; Reumann *et al.*, 1998) y cloroplastos de plantas (Bolter y Soll, 2001) en cuyo interior forman largos canales acuosos, permitiendo la entrada selectiva de componentes hidrofílicos (Schirmer, 1998).

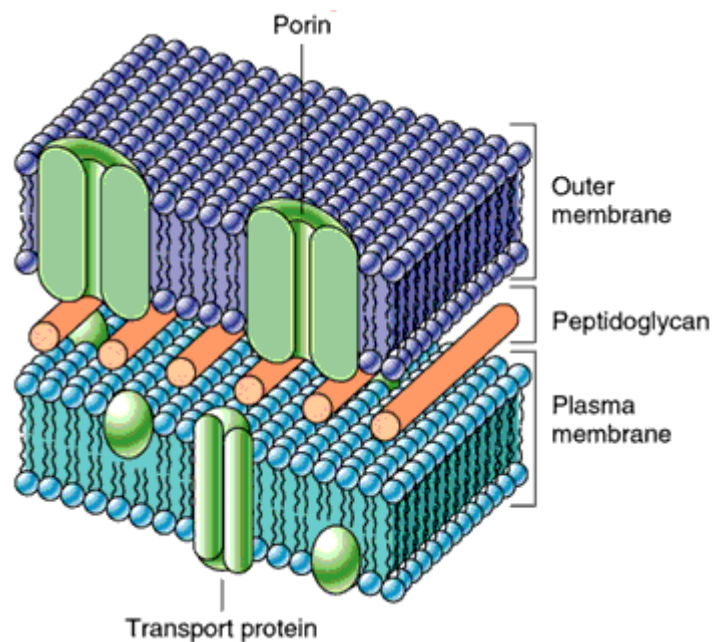


Figura 4: Estructura de la membrana de bacterias Gram negativas.

En general, las porinas se dividen en dos grupos: porinas de difusión no específica, las cuales seleccionan entre solutos hidrofílicos basándose en el tamaño molecular, y las porinas específicas, que contienen sitios específicos de unión para ciertos solutos, siendo selectivas para mono- y disacáridos (LamB, ScrY), nucleosidos

(TsX), e iones. El estado funcional de la mayoría de las porinas es un trímero, donde cada unidad forma un canal distinto, cuyo cierre es mediado por alto voltaje. La estructura de cada monómero, entre 300 y 420 aminoácidos de longitud, está plegada en 16-18 filamentos de estructura  $\beta$ -barrel antiparalela, unidas por conexiones que forman loops que constriñen el poro, pudiendo adoptar dos estados conformacionales, el estado abierto, el cual es selectivo para aniones pequeños y el estado cerrado, en el cual disminuye la conductividad y aumenta la selectividad para cationes.

## **7. Herbicidas**

Las malas hierbas, junto con los parásitos son una de las causas más importantes de pérdidas económicas en los cultivos. Pese a que han aumentado considerablemente los cultivos en los que el control de las malas hierbas se lleva a cabo sin el uso de agroquímicos, más del 90% de las prácticas agrícolas actuales utilizan herbicidas para su control. En los últimos años se ha producido un aumento vertiginoso en el uso de herbicidas para la mejora de la productividad de las cosechas, ya que la competencia de las plantas no cultivadas por los recursos ocasiona un problema para la obtención de altas producciones, acordes a las necesidades de los agricultores. Además las malas hierbas dificultan las labores agrícolas, contaminan y son importantes transmisores de plagas. Por ello para el control en la explotación agrícola son empleados los herbicidas, definidos como cualquier sustancia o mezcla utilizada para controlar plantas indeseables. La actividad de éstos se fundamenta en función de la capacidad de modificar o interrumpir el metabolismo celular, a través del cual se regula el crecimiento y desarrollo de la planta, siendo las alteraciones morfológicas externas, meras respuestas causadas por cambios bioquímicos a nivel celular. De otra manera se pueden erradicar eficazmente las malas hierbas manteniendo los restos vegetales para proteger la superficie del suelo contra la erosión del agua, viento y pérdida de humedad.

El herbicida glifosato constituye uno de los descubrimientos agroquímicos más importantes del siglo XX, siendo uno de los herbicidas más empleados actualmente por su seguridad, efectividad y por sus aplicaciones diversas. Y se estima que la superficie tratada con glifosato irá en aumento.

### **7.1. Herbicidas y fijación de nitrógeno**

La fijación simbiótica de nitrógeno, como ya hemos descrito, puede ser llevada a cabo por las leguminosas, cultivadas abundantemente no sólo por su potencial como fijadoras de nitrógeno sino también porque existe una gran variedad de especies, las cuales son una excelente fuente de proteínas y grasas para animales y para el hombre; sin embargo, dichos cultivos son muy sensibles a los herbicidas, existiendo no sólo un

efecto directo sobre la planta sino también un efecto indirecto sobre la microflora de la rizosfera por supresión de su crecimiento (Abd-Alla *et al.*, 2000) provocando generalmente inhibición del desarrollo en la planta.

De esta forma la afección de los rizobios en la rizosfera, causa efectos adversos sobre la interacción microorganismo-planta, tan importante para el establecimiento de la simbiosis (de Rosa *et al.*, 1978), afectando a la formación del órgano simbiótico y a la capacidad de fijación de nitrógeno (Madhavi *et al.*, 1993).

En el estudio del efecto de los herbicidas sobre el proceso simbiótico se manifiesta una gran variabilidad de resultados dependiendo de la especie de la planta, así como del tipo de herbicida, tratamiento y condiciones ambientales. Los herbicidas pueden alterar el metabolismo de la leguminosa y originar una acción sobre el nódulo que alteraría la actividad del enzima nitrogenasa. La disminución de esta actividad afectaría de forma negativa a la capacidad de nitrógeno.

En experimentos con diferentes herbicidas en la simbiosis *Lupinus albus-Bradyrhizobium* sp. (*Lupinus*) se comprobó la reducción de la actividad nitrogenasa (de Felipe *et al.*, 1987; Fernández-Pascual *et al.*, 1988; Fernández-Pascual *et al.*, 1992). El efecto difería según el tipo de herbicida empleado. Con la simazina y el Lindex, la afectación se hizo patente sobre el desarrollo y formación nodular, ocasionando alteraciones en las estructuras del cloroplasto y nódulo (simazina), con un resultado menor en la producción final del grano de la leguminosa (de Felipe *et al.*, 1987). Profundizando en el estudio Fernández-Pascual *et al.*, 1988, señalaron cambios en el metabolismo proteico nodular bajo el efecto de los dos componentes activos del herbicida Lindex: cianacina y linuron. Para estos autores los efectos adversos sobre la nitrogenasa fueron debidos a la acción sobre el aparato fotosintético. No obstante, las alteraciones por los herbicidas no sólo se produjeron en la estructura del cloroplasto en la hoja y en la zona infectada del nódulo, sino que también experimentos con alacloro y carbetamida modificaron la estructura de la corteza, en concreto la zona II o corteza media relacionada con la regulación de la barrera de resistencia a la difusión de oxígeno causando un efecto de senescencia prematuro en las células del cortex (Fernández-Pascual *et al.*, 1992). En general diferentes estreses, como elevada temperatura, oscuridad, nitrato o salinidad (de Lorenzo *et al.*, 1993; Serraj *et al.*, 1995; Fernández-Pascual *et al.*, 1996), también causaron una disminución en la actividad nitrogenasa debido a un incremento en la resistencia de la barrera de difusión de O<sub>2</sub>. Contrariamente a estos resultados Pozuelo *et al.*, 1989 observaron un efecto beneficioso de los herbicidas cianazina, trifluralina y simazina sobre la actividad nitrogenasa y la producción de grano.

Desde la perspectiva de la fijación de nitrógeno, la respuesta del *Lupinus* en simbiosis al estrés abiótico (herbicida), tiene patrones comunes con el resto de las

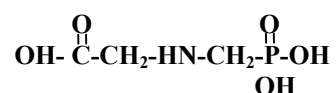
asociaciones simbióticas de las diferentes leguminosas. La disminución de la actividad nitrogenasa puede atribuirse según algunos autores a un efecto directo sobre la fisiología nodular o indirectamente deberse a la disminución del aporte de fotosintetizados al nódulo vía floema (Bethlenfalvay *et al.*, 1979), sin tener por qué afectar negativamente sobre el crecimiento del microsimbionte (de Felipe *et al.*, 1987).

Otros herbicidas, en estudios paralelos con diversas leguminosas, provocaron resultados similares en los que la disminución de la nodulación y la actividad nitrogenasa (Mallik y Tesfai, 1985; Cardina *et al.*, 1986; Bollich *et al.*, 1988; Martensson y Nilsson, 1989; Martensson, 1992) fueron consecuencia de la inhibición del crecimiento de la planta simbiótica por un efecto directo sobre la propia planta (Sprout *et al.*, 1992; González *et al.*, 1996; Singh y Wright, 1999; Royuela *et al.*, 2000).

Así se describió en leguminosas aumentos en la producción de grano (Vidals *et al.*, 1992), alteraciones en el nódulo (Hernández *et al.*, 1999), en el tallo (Perigio *et al.*, 1991) y en el desarrollo nodular (Haider *et al.*, 1991). Sin embargo, también es posible que el herbicida ejerza un efecto indirecto sobre la bacteria y disminuya la capacidad del *Rhizobium* y del *Bradyrhizobium* de nodular (Moorman *et al.*, 1986; Martensson, 1992; Madhavi, 1993; Royuela *et al.*, 1998; Moorman *et al.*, 1992; Hernández *et al.*, 1999), o que inhiba el crecimiento en especies como *Azotobacter* sp. (Santos y Flores, 1995).

## 7.2. Glifosato: características

El glifosato es una molécula formada por una fracción de glicina y un radical aminofosfato unido como sustituyente de uno de los hidrógenos del grupo  $\alpha$ -amino.



Las formulaciones de glifosato se encuentran registradas en más de cien países, siendo utilizado en más de sesenta cultivos, en manejo de bosques sometidos a intervención para su conservación, y en sistemas de cultivos diferentes incluidos el mantenimiento de los jardines.

Por la naturaleza de sus propiedades físicas y químicas, el glifosato es un plaguicida perteneciente al grupo de los herbicidas de acción sistémica por la vía foliar. Puede tener una reducida movilidad en el suelo cuando coinciden condiciones de pH alto y presencia de fosfatos no orgánicos en cantidades grandes. Además el glifosato es adsorbido y rápidamente fijado en el suelo. La materia orgánica, la arcilla, el sedimento y la arena contenidos en el suelo, así como el pH del mismo, influyen en el proceso en forma mínima. Por lo que dada su alta afinidad por los componentes del suelo, el glifosato

es prácticamente inmóvil con una mínima probabilidad de transporte por lixiviación o arrastre por escorrentía.

Por otra parte, el glifosato no es un herbicida de acción residual prolongada y su efecto es de corta duración al inactivarse rápidamente mediante la formación de complejos de óxido de hierro y aluminio que le hacen precipitar (Morillo *et al.*, 2000). La molécula de glifosato es degradada, principalmente por acción de los microorganismos del suelo, que tienen la habilidad enzimática de romper el enlace muy estable C-P del ácido fosfórico, para liberar el fosfato orgánico (Liu *et al.*, 1991). La degradación del glifosato por descomposición enzimática de los microorganismos se realiza a través de dos vías que originan metabolitos biológicamente inactivos; una vía mayoritaria de formación de ácido amino metil fosfónico (AMPA, Veiga *et al.*, 2001; Araújo *et al.*, 2003) y la otra vía de formación de sarcosina (N-metilglicina) y ortofosfato. Además en la degradación se produce agua, dióxido de carbono y fosfato (Forlani *et al.*, 1999). Los suelos ricos en materia orgánica, moderadamente ácidos y pobres en nutrientes parecen promover la adsorción del herbicida y facilitar su degradación reduciendo la movilidad (Veiga *et al.*, 2001).

En general, el glifosato es un herbicida de amplio espectro, baja selectividad y mínimos efectos ambientales, utilizado en post-emergencia (Smith y Oehme, 1992). No actúa sobre las semillas que existieran por debajo del suelo y tampoco es absorbido por las raíces.

### 7.2.1. Modo de acción

En 1974 el herbicida glifosato, ingrediente activo del herbicida Roundup, no selectivo y no contaminante (Grossbard y Atkinson, 1985; Smith y Oehme., 1992), fue introducido en varios mercados mundiales, por Monsanto y se ha convertido en uno de los productos más utilizados para el control de malas hierbas, facturando el 11% de ventas mundiales de herbicidas (Powles *et al.*, 1997).

El glifosato actúa inhibiendo la ruta del ácido shikímico (fig. 5), al ser un inhibidor competitivo con el fosfoenolpiruvato en la condensación de éste con el shikimato-3P llevada a cabo por la enzima 5-enolpiruvilshikimato-3 fosfato sintasa (EPSPs; E.C. 2.5.1.19; Amrhein *et al.*, 1980; Herrmann y Weaver, 1999; He *et al.*, 2001), causando una reducción en la síntesis de aminoácidos aromáticos: fenilalanina, tirosina y triptófano. Además inhibiendo la biosíntesis de aminoácidos aromáticos en plantas, la interacción entre el glifosato y la EPSPs interfiere con la producción de compuestos secundarios derivados de los aminoácidos aromáticos (Dewick, 1998). La biosíntesis de proteínas, auxinas, compuestos de defensa, fitoalexinas, ácido fólico, ácidos cinámicos, precursores de lignina, flavonoides, plastoquinona y otros compuestos fenólicos y alcaloides deben

estar afectados por la inhibición de la enzima implicada en la biosíntesis de aminoácidos aromáticos que sufren el déficit de éstos. Este herbicida también inhibe en menor grado otras enzimas implicadas en la ruta de síntesis del ácido shikímico como la enzima 3-deoxiarabinoheptulosoato-7-fosfato sintasa (DAHP sintasa; E.C.4.1.2.15; Rubin *et al.*, 1982) y la dehidroquinato sintasa (DHKS, E.C. 4.6.1.3).

La EPSPs convierte el shikimato-3-fosfato y PEP en 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato y fósforo inorgánico, en el sexto paso de la ruta de aminoácidos aromáticos (Schmid *et al.*, 1995; Siehl, 1997; Herrmann y Weaver, 1999). Su inhibición conduce a la desregulación de la ruta de biosíntesis, debido al incremento en la actividad de la enzima DAHP sintasa (Jensen, 1985) que cataliza la condensación entre PEP y eritrosa-4P. El aislamiento y caracterización de los ADNc correspondientes a las enzimas de la ruta de ácido shikímico en plantas superiores, han confirmado que los plastidios son el mayor y posiblemente el único sitio de biosíntesis de corismato, producto final de la ruta de ácido shikímico (Schmid y Amrhein, 1995; Herrmann y Weaver, 1999).

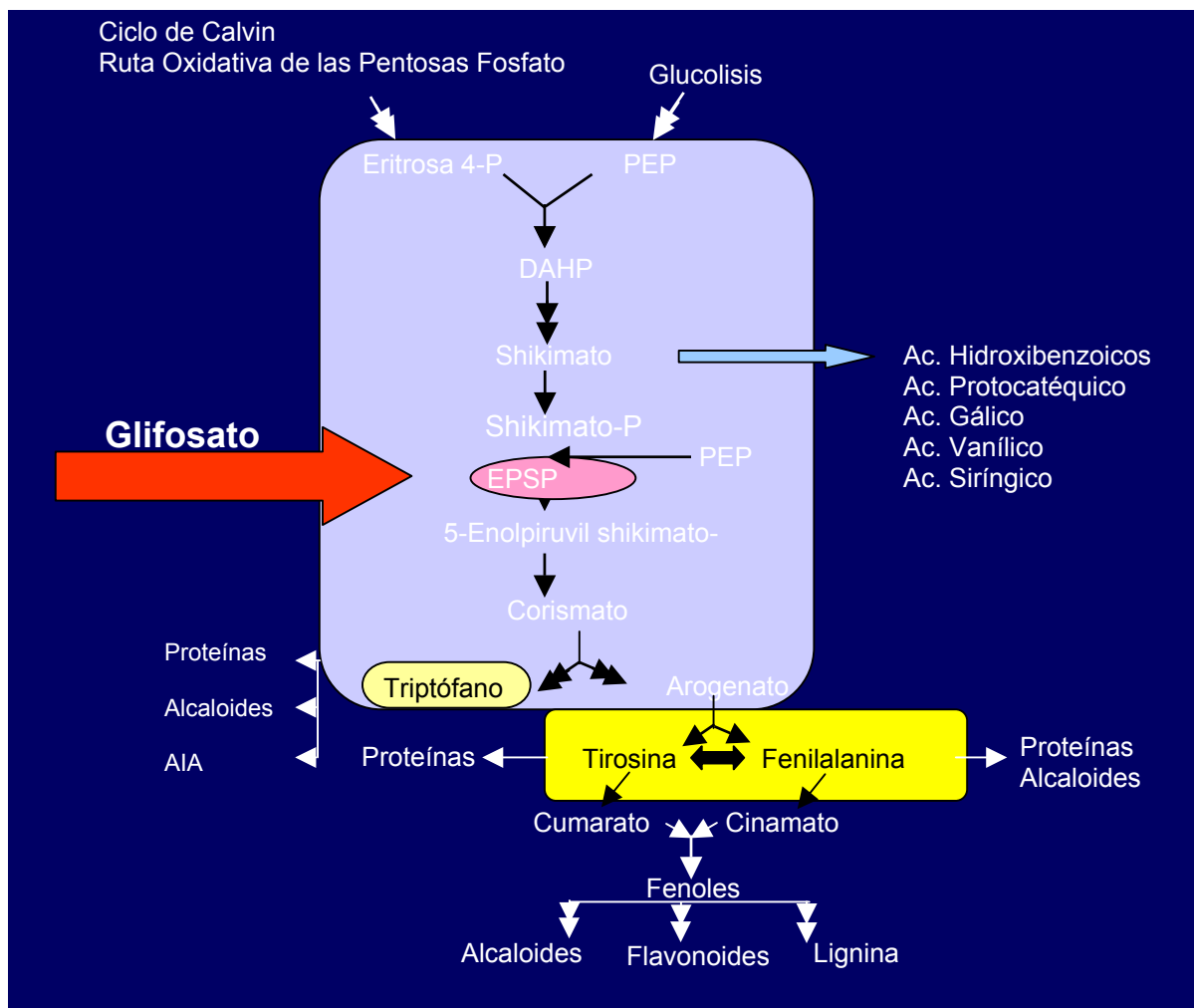


Figura 5: Ruta del ácido shikímico, donde actúa el herbicida glifosato (flecha).



Esta ruta se encuentra en plantas, hongos y bacterias, siendo estos los principales afectados por el herbicida (Dyer, 1994). En microorganismos, la síntesis del ácido shikímico es regulada por retroinhibición y represión de la primera enzima. En plantas superiores se sugiere que la regulación es a nivel genético (Herrmann y Weaver, 1999).

El glifosato se absorbe rápidamente por las hojas y es translocado a través del sistema simplástico (floema) y también, en muchas especies, a través del xilema. Se redistribuye siguiendo el flujo de sustancias fotosintetizadas depositándose en órganos consuntivos.

La acumulación de altos niveles de ácidos shikímico e hidroxibenzoicos es el resultado de la pérdida del control “*feedback*” de la ruta de síntesis del ácido shikímico, por debajo de los productos que regula la enzima DAHP. La falta de la regulación de DAHP puede causar un flujo descontrolado de carbono hacia la ruta de ácido shikímico, provocando un desvío de los intermediarios de otros procesos previos al bloqueo de la enzima EPSPs (Jensen, 1985), como el ciclo de Calvin, ruta oxidativa de las pentosas fosfato o la glucólisis, alterando finalmente el metabolismo celular (Kilmer *et al.*, 1981).

### 7.2.2. Efectos adversos

Las características, anteriormente descritas, inmovilidad, rápida inactivación y biodegradación en el suelo (Malik *et al.*, 1989), hacen del glifosato un herbicida de elevada eficacia para el control de la mayoría de especies gramíneas y dicotiledoneas consideradas como malas hierbas y particularmente sobre especies perennes (Bradshaw *et al.*, 1997).

Sin embargo, a pesar de los beneficios inmediatos conseguidos con su utilización, en mejora de la productividad pueden darse efectos colaterales indeseados sobre otros organismos (Haughton *et al.* 2001; Klimek *et al.* 2001), pudiendo afectar a la microflora (Chakravarly y Chatarpaul, 1990) y a especies vegetales del entorno al migrar al suelo (Matt *et al.* 2001). Estos efectos adversos son debidos a que una de las vías más importantes de eliminación de los herbicidas es la producida por la absorción de los mismos por las plantas adventicias y su posterior fijación en centros específicos, donde inhiben determinadas enzimas responsables del metabolismo celular.

La presencia de glifosato en el suelo puede causar cambios en la población y la actividad microbiana del suelo (Araújo *et al.*, 2003), así lo demuestran numerosos experimentos que evalúan los efectos perjudiciales del herbicida sobre diferentes microorganismos (Christy *et al.*, 1981; Quinn *et al.*, 1988; Santos y Flores, 1995; Krzysko-Lupicka y Orlik, 1997). Más recientemente Busse *et al.*, 2001 demuestran un descenso del crecimiento y del metabolismo de la supervivencia bacteriana del suelo en plantaciones de *Pinus ponderosa*. Asimismo, Wong, 2000 señala la inhibición del

crecimiento, fotosíntesis y síntesis de clorofila a, en algas verdes. En el medio acuático Tsui y Chu *et al.*, 2003 analizan el porcentaje de toxicidad que afecta a las poblaciones diferentes en este medio, siendo las de crustáceos y microalgas, las más afectadas.

Por el contrario, estos efectos adversos en los diversos procesos, en ocasiones son matizados e incluso revertidos mayoritariamente en condiciones naturales, por los factores edafoclimáticos del medio donde se desarrollan, entre los que se incluyen: luz, aireación, balance hídrico, pH, temperatura, humedad, materia orgánica, nutrientes y la presencia de otros microorganismos (Walsh, 1995), así como por la concentración del herbicida en el medio, degradación, movilidad en el suelo y el tipo de planta. Asimismo, se ha comprobado que existe un efecto nulo o estimulante con la aplicación del glifosato, sobre la respiración y actividad microbiana del suelo (Carlisle y Trevors, 1986; Haney *et al.*, 2000; Busse *et al.*, 2001; Araújo *et al.*, 2003), mineralización del suelo (Haney *et al.*, 2000; 2002) o la biomasa microbiana (Wardle y Parkinson, 1991, 1992).

Por otro lado, la importancia de los microorganismos simbióticos para llevar a cabo una agricultura sostenible que reduzca el uso de fertilizantes nitrogenados y fosfatados hace necesario el ahondar y conocer el efecto de los herbicidas en estas asociaciones. Ya que aunque hay numerosos estudios del efecto de plaguicidas sobre los microorganismos del suelo o sobre las especies vegetales (Anderson, 1985), se conoce muy poco sobre el efecto de los herbicidas en las asociaciones simbióticas.

### 7.2.3. Interacción de la resistencia fisiológica

La resistencia de las malas hierbas a los herbicidas, suele deberse a la presión selectiva que ejerce el uso repetido de herbicidas con un modo de acción específico en una misma zona y por tratar con frecuencia sin rotar con otros herbicidas. Actualmente hay identificados unos 109 biotipos de malas hierbas resistentes a herbicidas, siendo más de la mitad de ellos resistentes a los herbicidas de la familia de las triazinas (Le Baron, 1991; Shaner, 1995).

Hasta hace pocos años, los estudios técnicos no aportaban informaciones substanciales sobre la emergencia de resistencia fisiológica en algunas de las especies de malezas mas ampliamente tratadas con glifosato, a pesar de 20 años de su uso extensivo. Sin embargo, recientemente ha sido mostrada la existencia de poblaciones resistentes de *Lolium rigidum* en Australia (Pratley *et al.*, 1996; Powles *et al.*, 1998; Lorraine-Colwill *et al.*, 2001); y la resistencia al glifosato en un biotipo de *Eleusine indica* en Malasia (Tran *et al.*, 1999; Lee y Ngim, 2000; Baerson *et al.*, 2002) y en *Conyza canadensis* en el norte de América (Mueller *et al.*, 2003). En todos menos en un caso (Lee y Ngim, 2000), los biotipos de las malas hierbas resistentes ocurrieron en áreas

sujetas a la aplicación repetida de glifosato durante por lo menos 10 años antes de su emergencia.

Por otra parte en el primer estudio de los mecanismos que confieren la resistencia al glifosato se ha puesto de manifiesto que una única sustitución en un aminoácido (Ser en la posición 106 por Pro) de la EPSPs contribuye significativamente a la reducción de la sensibilidad al glifosato, siendo estos resultados la primera evidencia de la EPSPs alterada como un componente subyacente de la resistencia del glifosato evolucionada en cualquier especie de plantas (Baerson *et al.*, 2002).

A pesar de estas consideraciones, actualmente se acepta que la tolerancia de las plantas y microorganismos al glifosato se basa en tres mecanismos (Devine *et al.*, 1993). El primer mecanismo es la sobreproducción de la enzima EPSPs, el segundo es la alteración de la enzima EPSPs, apareciendo como un isoenzima resistente al glifosato y el tercer mecanismo es la degradación metabólica del herbicida.

Hasta la fecha los dos primeros mecanismos se han podido inducir en algunos cultivos. Aunque en España no se han comercializado variedades resistentes al herbicida, en varios países del mundo los cultivos tolerantes al glifosato se introdujeron hace años y siguen en aumento, entre los que se incluyen soja, maíz, arroz, algodón, tabaco, canola, trigo, remolacha y patata. Las técnicas de ingeniería genética han permitido la incorporación del gen CP4-EPSPs que incrementa la tolerancia al glifosato en el genoma de la planta (Barry *et al.*, 1992; Padgett *et al.*, 1995; Nida *et al.*, 1996; Pline *et al.*, 2002). Sin embargo, actualmente existen restricciones de este germoplasma para programas de investigación y su aceptación en algunos países no ha sido fácil. Esta tolerancia al glifosato por la planta no evitaría que la dosis utilizada del herbicida afectara a las relaciones simbióticas con los rizobios en las raíces de las leguminosas, con un resultado adverso sobre la fijación de nitrógeno. Con lo que, el glifosato al traslocarse rápidamente desde las hojas a los sumideros metabólicos (Duke *et al.*, 1988; Geiger y Bestman, 1990), como el nódulo, podría incorporarse en éste en altos niveles, causando interferencias sobre el proceso de fijación de nitrógeno en bacteroides, y en consecuencia disminuyendo la actividad nitrogenasa bacteroidal (Hernández *et al.*, 1999).

## 8. Metabolismo fenólico

Los compuestos fenólicos son biosintetizados por varias rutas diferentes y constituyen un grupo heterogéneo desde el punto de vista metabólico. Dos rutas básicas son implicadas: la ruta del ácido shikímico y la ruta del ácido malónico. La ruta del ácido shikímico participa en la biosíntesis de la mayoría de los compuestos fenólicos y transforma los intermediarios del carbono procedentes de la glucólisis y de la ruta de las pentosas fosfato en aminoácidos aromáticos (Herrmann y Weaver, 1999). La ruta del

ácido malónico, aunque es una importante fuente de productos fenólicos secundarios en hongos y bacterias, tiene un menor significado en plantas superiores.

La inhibición de la enzima EPSPs tras la aplicación del glifosato, no sólo tiene como efecto el déficit más o menos drástico de los productos finales de la ruta del ácido shikímico (Colé, 1985), sino que también produce un incremento en la actividad de la ruta pudiendo sustraer esqueletos carbonados de otras rutas esenciales (Devine *et al.*, 1993). Al mismo tiempo que provocar un incremento en la producción y acumulación de los intermediarios fenólicos, ácido shikímico y ácidos hidroxibenzoicos (Moorman *et al.*, 1992). Estos ácidos pueden resultar potencialmente tóxicos al afectar al metabolismo celular de la leguminosa. Cada uno de estos factores contribuye de forma parcial a la toxicidad global del glifosato y es la base de las diferencias en la tolerancia a este compuesto entre los organismos.

La acumulación del ácido shikímico conlleva además al aumento de la producción de ácidos benzoicos derivados del shikímico, como los ácidos protocatéquico y gálico en plantas (Lyndon y Duke, 1988; Haslam, 1993). Los ácidos benzoicos son considerados agentes alelopáticos y autoalepáticos al inducir toxicidad sobre otras plantas o microorganismos del suelo tras ser liberados después de la descomposición de la planta (Putnam y Tang, 1986), y sobre los propios tejidos de la planta o el bacteroide.

En general Moorman *et al.*, 1992 sugieren que la alteración del metabolismo fenólico por el glifosato podría causar dos efectos: el primero, una alteración fisiológica y ecológica puesto que los compuestos flavonoides juegan un importante papel en el reconocimiento *Rhizobium*-leguminosa, y el segundo la acumulación de ácidos fenólicos que podría interferir con el proceso de fijación de nitrógeno en el nódulo.

Existen diferencias entre plantas y microorganismos en la producción de fenoles con el tratamiento con glifosato. Mientras en bacterias los ácidos fenólicos se expulsan al medio externo (Moorman *et al.*, 1992), en las plantas se acumulan en órganos sumideros (Cañal *et al.*, 1987). Por tanto, en condiciones simbióticas, los nódulos de las plantas tratadas con glifosato podrían aumentar la concentración de ácidos fenólicos por la continua excreción de los mismos por el bacteroide, así como debido a la propia producción en el citosol. Además estos compuestos pueden aumentar su toxicidad por transformaciones en el propio metabolismo celular (Becerril *et al.*, 1989). No obstante, hay que tener en cuenta por jugar un importante papel en la acumulación de estos ácidos, el potencial biodegradativo de los rizobios por su versatilidad nutricional y su capacidad para degradar sustancias aromáticas (fenoles, ácidos benzoicos y compuestos nitroaromáticos) en plantas y suelos (Muthukumar *et al.*, 1982).



## *OBJETIVOS*







Cuando se aborda el estudio sobre una interacción planta-microorganismo, así como el efecto que producen determinadas condiciones externas sobre dicha interacción, se hace necesario llevar a cabo el análisis integrado del efecto que producen estas condiciones sobre cada organismo y de sus repercusiones sobre la interacción.

De esta forma, en nuestro estudio de la simbiosis *Bradyrhizobium* – *Lupinus albus* y del efecto que sobre ella produce el herbicida glifosato, se ha considerado al huésped y al simbionte como un conjunto, ya que la efectividad e infectividad de la bacteria, así como las modificaciones morfológicas y bioquímicas que se producen en la planta dependerán tanto del microsimbionte, la especie de *Rhizobium*, como del macrosimbionte, la planta leguminosa.

Para ello, se llevará a cabo un estudio integrado del efecto de glifosato sobre el microsimbionte en vida libre y en simbiosis, así como sobre el macrosimbionte.

La figura 6 representa el esquema de estudio integrado, en el que nos propusimos los siguientes objetivos, para determinar el efecto del glifosato sobre:

1. Los parámetros de crecimiento de la planta y la actividad nitrogenasa, así como sobre el crecimiento en vida libre de dos cepas del microsimbionte *Bradyrhizobium* sp. (*Lupinus*), ISLU16 y L750.
2. La ultraestructura celular de nódulos y hojas en plantas de *Lupinus albus*.
3. Los principales cambios sobre el metabolismo proteico, fenólico y de carbohidratos en plantas de *Lupinus* desarrolladas en condiciones simbióticas.

Además se llevará a cabo:

4. La caracterización de nuevas proteínas detectadas en el patrón polipeptídico de la planta (hojas, nódulos y bacteroides) inducidas por el herbicida.
5. El Análisis de la expresión de los genes codificantes de las nuevas proteínas detectadas y el estudio de su estructura para el establecimiento de la relación estructura-función en la respuesta del microsimbionte al tratamiento.

Efecto de glifosato en la simbiosis *Bradyrhizobium-Lupinus*

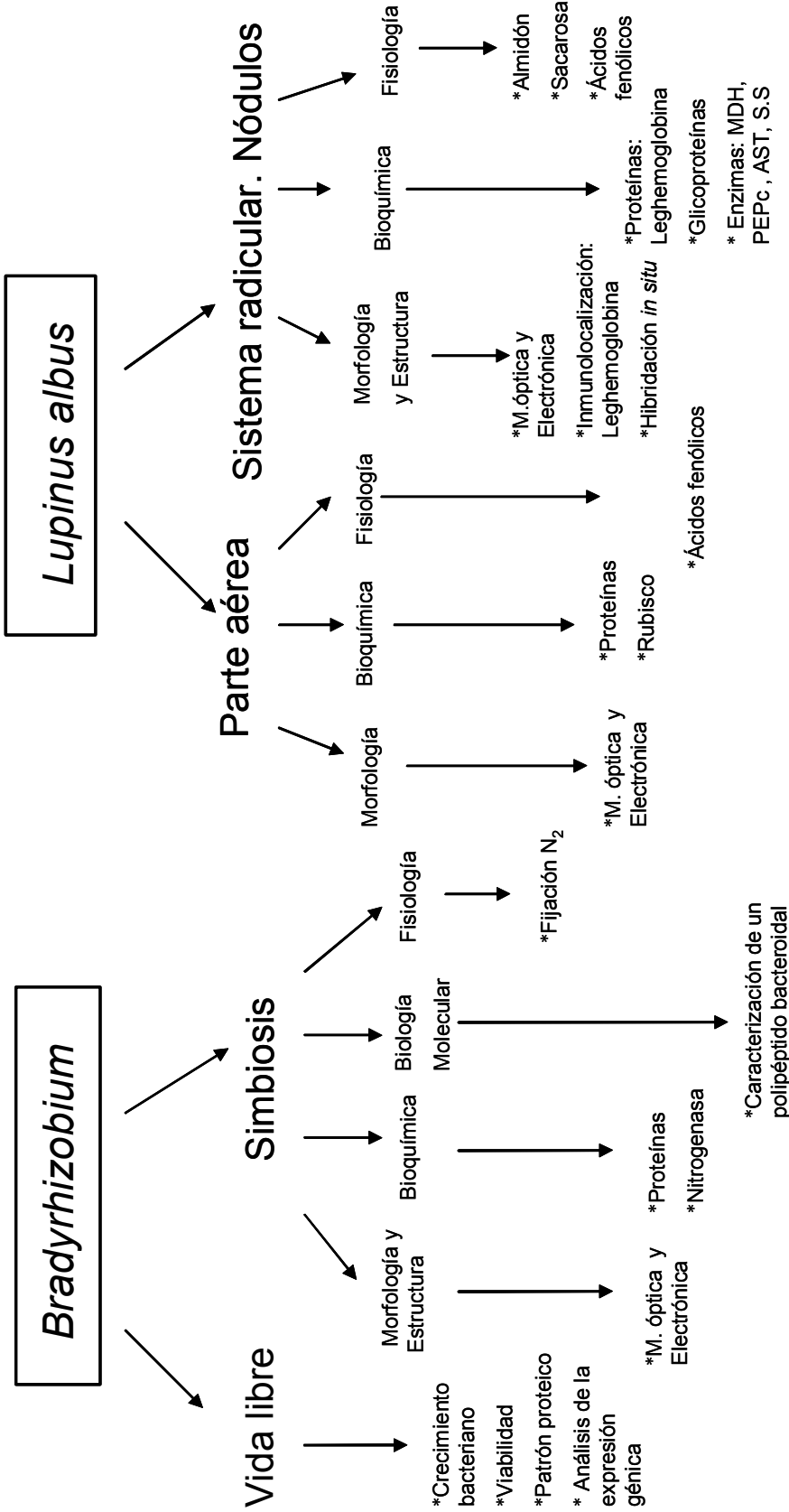


Figura 6: Esquema de los objetivos planteados para la Tesis Doctoral.



*MATERIALES  
Y MÉTODOS*





## 1. Materiales

### 1.1. Material vegetal

En todos los experimentos se han empleado semillas de *Lupinus albus* L. cv. Multolupa, procedentes de la finca experimental “La Higuera” (Santa Olalla, Toledo), adscrita al Centro de Ciencias Medioambientales, CSIC, Madrid.

### 1.2. Microorganismos

En los experimentos llevados a cabo se han empleado las bacterias siguientes:

- *Bradyrhizobium* sp. (*Lupinus*) cepa ISLU16 y cepa L750, procedentes de la colección del Dr. Chamber del Centro de Investigación y Desarrollo Agrario “Las Torres y Tomejil”. Sevilla.
- *Escherichia coli* cepa DH5 $\alpha$  y cepa SURE (*Stratagene*).

### 1.3. Medios de cultivo

- Medio TY pH 6,8: triptona 0,6%; extracto de levadura 0,3%; CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 0,066%.
- Medio Vincent pH 6,8: K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,05%; MgSO<sub>4</sub>·7 H<sub>2</sub>O 0,02%; manitol 1%; extracto de levadura 0,04%; NaCl 0,01%.
- Medio LB (Luria-Bertani) pH 7,0: bacto-triptona 1%; extracto de bacto-levadura 0,5%; NaCl 1%.

### 1.4. Oligonucleótidos

En los ensayos hemos empleado los siguientes oligonucleótidos.

AP1: 5'-GTAATACGACTCACTATAGGGC

AP2: 5'-ACTATAGGGCACGCGTGGT

n1: 5'-TACGGCGCCGGCTTCTACTACATCC

n2: 5'-TAAGGTCGACACGGGATTGAGCAGT

n3: 5'-ATGGGCAAACCTATCCGGCGAACAGCTT

n4: 5'-TACGTAATGCTCGACCAGAAGTATG

F24: M 13 (-47): 5'-CGCCAGGGTTTTCCAGTCACGAC

R24: M 13 reversa (-48): 5'-AGCGGATAACAATTCACACAGGA

### 1.5. Herbicida

El herbicida glifosato [N-(fosfonometil) glicina], fue obtenido de Monsanto en forma de líquido miscible conteniendo 36% (p/v) del producto activo en forma de sal isopropiónica.

## 2. Métodos

### 2.1. Siembra, inoculación y crecimiento vegetal

Para la siembra las semillas se esterilizaron con  $\text{HgCl}_2$  1% durante 5 min en agitación suave, y posteriormente se lavaron abundantemente, varias veces, con agua destilada estéril. Finalmente se dejaron en imbibición durante una hora en agua destilada estéril. La siembra se llevo a cabo en macetas de 15 cm de alto x 8,5 cm de ancho, en un soporte inerte de vermiculita (Asfaltex S.A), lavada previamente. Inicialmente se sembraron tres semillas/maceta y se inocularon en el momento de la siembra y 7 días después, con 1 ml de una suspensión bacteriana ( $10^8$  bacterias/ml) de la cepa ISLU16. Tras la germinación se dejó una sola planta por maceta, eliminando el resto.

Las plantas se mantuvieron en una cámara de crecimiento vegetal cuyas condiciones de luz, temperatura y humedad relativa estuvieron controladas (fig. 7). Se mantuvo un fotoperiodo de 16 horas, con una intensidad luminosa de  $190 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , suministrada por tubos fluorescentes (Silvania Gro-Lux) y bombillas incandescentes de 25 W (General electrics). La variación de temperatura día/noche fue de 25/15 °C y la humedad relativa del 60-70%. Las plantas fueron regadas durante la primera semana con agua destilada estéril y las siguientes con solución nutritiva Hoagland pH 6,5 libre de nitrato para favorecer la nodulación (Hoagland *et al.*, 1950):  $\text{K}_2\text{SO}_4$ , 0,479 g/l;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,260 g/l;  $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0,102 g/l;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,066 g/l; Hampiron (Rhône Poulec) 0,031 g/l y solución de oligoelementos 1 ml/l:  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 7,24 g/l;  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 5,72 g/l;  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,44 g/l;  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , 0,32 g/l;  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 0,25 g/l;  $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 5,9 g/l;  $\text{CoCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,25 g/l.



Figura 7: Plantas de *Lupinus albus* crecidas en condiciones controladas, antes de la aplicación del herbicida.



En los experimentos sobre el metabolismo fenólico, se añadió nitrato (2,5 mM) a la solución de riego, en forma de  $\text{KNO}_3$ , y se suministró a las plantas sin inocular.

## 2.2. Condiciones de cultivo bacteriano

Las cepas de *Bradyrhizobium* ISLU16 y L750 se cultivaron en medio Vincent (Vincent, 1970), a 28 °C, en agitación a 100 rpm hasta alcanzar la densidad óptica correspondiente a la fase exponencial de crecimiento.

En la extracción de ADN y ARN bacteriano, la cepa de *Bradyrhizobium* ISLU16 se creció hasta saturación, a 28 °C en medio TY (Sambrook *et al.*, 1989) y las cepas de *Escherichia coli* fueron cultivadas en medio LB (Sambrook *et al.*, 1989) a 37 °C, en agitación a 250 rpm con el antibiótico de selección adecuado.

## 2.3. Estimación del crecimiento bacteriano y número de viables

El crecimiento bacteriano se determinó, midiendo la densidad óptica del cultivo a  $\lambda=680$  nm mediante un espectrofotómetro modelo Spectronic 2000.

El número de viables, para las cepas ISLU16 y L750 se determinó estimando el número de unidades formadoras de colonias (UFC), partiendo del método propuesto por Vincent (1970).

Cada 24 horas se tomó una muestra de 0,1 ml de cultivo de los matraces con diferentes tratamientos y se hicieron diluciones seriadas en agua destilada estéril hasta diluir la concentración inicial diez veces; se tomaron 0,1 ml de cada dilución y se sembraron en placa Petri con 20 ml de medio Vincent sólido. Las placas se incubaron a 25 °C, hasta la aparición de colonias. Todas las manipulaciones se realizaron en condiciones estériles, con tres réplicas (placas) por cepa y tratamiento.

## 2.4. Aplicación del tratamiento en plantas y microorganismos

Para estudiar el efecto del glifosato sobre *Lupinus albus*, cada planta se pulverizó con 2 ml (fig. 8), previamente filtrados, de la solución del herbicida glifosato, cinco semanas después de la siembra. El glifosato (N-[fosfonometil] glicina, Monsanto), en forma de sal de isopropilamina, fue aplicado a la dosis recomendada por la casa comercial (1,12 Kg/Ha=10 mM) y sucesivas diluciones a la mitad (5; 2,5 y 1,25 mM).

Para testar la tolerancia bacteriana al herbicida, se inoculó 1 ml de un cultivo en fase exponencial, de las cepas ISLU16 y L750 en medio Vincent, al que previamente se le había añadido (por filtración) el herbicida a las concentraciones finales de 7,81; 15,62; 31,25; 62,5; 125 y 250  $\mu\text{M}$ . La tolerancia de las distintas cepas al herbicida, se utilizó

como criterio de selección para inocular plantas de *Lupinus* que posteriormente fueron tratadas con el herbicida.



Figura 8: Forma de aplicación del herbicida glifosato sobre las plantas

## 2.5. Determinación de la actividad nitrogenasa

La actividad fijadora de nitrógeno se midió mediante el ensayo convencional de reducción de acetileno (ARA) según Fernández-Pascual *et al.*, (1988). Las medidas de etileno y acetileno se llevaron a cabo en un cromatógrafo de gases Perkin-Elmer 8310, equipado con una columna de acero (2 m x 3 mm de diámetro) rellena con Porapak-R y empleando nitrógeno como gas portador a una velocidad de flujo de 50 ml/ min, según de Felipe *et al.*, (1987). Aunque disponemos, en nuestro departamento, de un sistema de flujo continuo, para la medida de la actividad nitrogenasa (Fernández-Pascual *et al.*, 1996; Minchin *et al.*, 1992; Guasch *et al.*, 2001), el elevado número de tratamientos y de réplicas (5 concentraciones diferentes y 6 réplicas por tratamiento) hacen imprescindible el uso del ARA convencional para la medida de la actividad nitrogenasa en estos experimentos.

Las plantas se separaron suavemente del soporte y se cortó la raíz a nivel del cambio de color con la parte aérea. El sistema radical se introdujo en un tubo de vidrio (100 ml) cerrado herméticamente. Después de equilibrar las presiones interna y externa, se extrajeron 10 ml de la atmósfera interior y se introdujo 10 ml de  $C_2H_2$ .

La reacción de reducción tuvo lugar a 25 °C. Las muestras de gas se tomaron cada 15 minutos de exposición al acetileno para eliminar los problemas de la planta sometidos a largas exposiciones de acetileno (Sinclair y Serraj, 1995). Transcurrido ese tiempo se extrajo una muestra de 0,5 ml que se valoró en el cromatógrafo de gases, obteniendo la cantidad de  $C_2H_4$  (nmol) presentes en la muestra.

El cálculo de la actividad nitrogenasa, se obtuvo según la ecuación:

$$\text{Actividad } (\mu\text{mol C}_2\text{H}_4 \cdot \text{g}^{-1}) = \frac{\mu\text{mol/planta C}_2\text{H}_4 \cdot v}{P}$$

donde

**v** = volumen del tubo (ml). **P**= peso fresco del nódulo (g/planta).

## 2.6. Técnicas de bioquímica de proteínas

### 2.6.1. Extracción y cuantificación

La extracción de proteínas de fracción soluble del citosol, se llevó a cabo mediante homogeneización de los nódulos y hojas en mortero, a 4 °C con tampón de extracción Tris HCl 0,1 M pH 8,0; EDTA 1 mM y mercaptoetanol (0,13 g/l). En hojas, la proporción del tampón de extracción fue de 1:25 (p/v) y 0,5 g de arena lavada; el homogeneizado obtenido se filtró con tres capas de gasas y seguidamente se centrifugó a 17.400 g a 4 °C, durante 30 min. En nódulos se extrajo con una proporción 1:10 (p/v) y PVPP insoluble al 30% (p/p), igualmente se filtró y se centrifugó a 11.400 g durante 5 min a 4 °C, en una centrífuga refrigerada Beckman modelo J2-21.

Para la extracción de proteínas citosólicas bacterianas de *Bradyrhizobium* sp. (*Lupinus*) ISLU16, el cultivo bacteriano fue centrifugado a 8.000 g durante 10 min, a 4 °C. El precipitado de esta centrifugación, se lavó dos veces con 1 ml de solución de lavado que contenía tampón K-fosfato 50 mM, sacarosa 300 mM y SO<sub>4</sub>Mg 2 mM. Seguidamente, el precipitado se resuspendió en tampón K-fosfato 20 mM, Cl<sub>2</sub>Mg 5 mM, EDTA 1 mM, glicerol 1 M y DTT 1 mM.

Las muestras se sonicaron con 25 pulsos de 50 s al 60% de intensidad, con un sonicador Vibra-Cell modelo VC-375. Después de verificar por microscopía óptica la ruptura de las bacterias, se centrifugó a 15.000 g durante 15 min a 4 °C.

La concentración de proteína de fracción soluble citosólica de hojas, nódulos, bacteroides y bacterias, se determinó en el sobrenadante por el método de Bradford (1976), utilizando seroalbúmina bovina como estándar y el reactivo de BIO-RAD según las indicaciones del fabricante.

### 2.6.2. Electroforesis de proteínas

Las electroforesis de proteínas totales se realizaron siguiendo la técnica de Laemmli (1970) en condiciones desnaturizantes con SDS (SDS-PAGE). Los geles separadores se realizaron en tampón Tris HCl 1 M pH 8,8 con persulfato amónico 0,5%,

TEMED 0,05% y SDS 0,1%. La concentración de acrilamida fue del 12,5% para proteínas totales o del 7% para glicoproteínas, y en los geles de gradiente la concentración fue del 7-18%. En los geles concentradores, la concentración de acrilamida contenida en el tampón Tris HCl 1,25 M pH 6,8 fue de 3,96%, conservándose la proporción de los demás componentes. La acrilamida usada fue de BIO-RAD con una proporción de 30:0,8 acrilamida/bisacrilamida. Las muestras (35-100 µg proteína) se prepararon añadiendo el tampón disociador de la muestra (Tris HCl 250 mM pH 6,8; SDS 4%; glicerol 10%; azul de bromofenol 0,006% y β-mercaptoetanol 2%) en proporción 100: 30 (p/v) y se hirvieron durante 5 min. La electroforesis se realizó en un sistema Mini Protean (BIO-RAD), con tampón de electrodos (Tris 25 mM, glicina 192 mM pH 8,3 y SDS 0,1%), a un voltaje de 80-100 V durante 2-3 horas. Como patrones se utilizaron los comercializados por BIO-RAD, de bajo peso molecular: lisozima 14,5 kDa, inhibidor de tripsina de soja 21,5 kDa, anhidrasa carbónica 31 kDa, ovoalbúmina 45 kDa, albúmina de suero bovino 66 kDa y fosforilasa β 97 kDa y los marcadores preteñidos: lisozima 21 kDa, inhibidor de tripsina de soja 28,9 kDa, anhidrasa carbónica 35 kDa, ovoalbúmina 52,3 kDa, albúmina de suero bovino 92 kDa y fosforilasa β 113 kDa, asimismo los marcadores de alto peso molecular utilizados fueron: miosina 212 kDa, α-macroglobulina 170 kDa, β-galactosidasa 116 kDa, transferrina 76 kDa, BSA 66 kDa y glutámico deshidrogenasa. Una vez finalizada la electroforesis, los geles se tiñeron con azul de Coomasie (ácido tricloroacético 50% (p/v), etanol 20% (v/v) y azul de Coomasie R250 (Sigma) 0,5 % (p/v)) durante al menos 30 min, o bien se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa o membrana de PVDF. Los geles teñidos se decoloraron con una solución desteñidora (metanol 25% y ácido acético 16,6%), renovada constantemente hasta la completa visualización de las bandas.

### **2.6.3. Análisis Western blot**

La transferencia se realizó en un sistema semiseco (TransBlot, BIO-RAD), con tampón de transferencia (Tris 25mM; glicina 192 mM; metanol 20% y SDS 0,04%), a 20 V durante 2 horas. Se comprobó la efectividad de la transferencia tiñendo la membrana durante 5 min con una solución Ponceau S (Sigma) al 0,2% en 1% de ácido acético y eliminando el exceso de agua. La tinción se eliminó al lavar la membrana con tampón de transferencia (Towbin *et al.*, 1979). La membrana de nitrocelulosa se bloqueó, para evitar uniones inespecíficas, con leche desnatada al 5% en PBS pH 7,2 (NaCl 0,8%; KCl 0,02%; HNa<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O 0,29%; H<sub>2</sub>KPO<sub>4</sub> 0,02% y NaN<sub>3</sub> 0,005%) durante 1 hora y se incubó con el anticuerpo primario durante toda la noche en agitación suave. En la inmunodetección de glicoproteínas MAC 236 y MAC 265, se emplearon las diluciones (1:100) del antisuero monoclonal obtenido en rata, según VandenBosch *et al.*, (1989).

Estos anticuerpos fueron cedidos por el Dr. N. Bewin del “John Innes Center” de Norwich (U.K.). Para la inmunodetección de la leghemoglobina se utilizó una dilución de (1:2000) del antisuero policlonal obtenido en conejo frente a leghemoglobina de lupino (Vivo *et al.*, 1989). En el inmunoblot del componente I y II de la nitrogenasa se utilizaron las diluciones (1:1000) y (1:2000) respectivamente del antisuero policlonal obtenido en conejo. El anticuerpo anti-componente I de la nitrogenasa fue cedido por el Dr. J. Imperial, ETSI Agrónomos de la Universidad Politécnica de Madrid y el anti-componente II, por el Dr. Ludden (Department of Biochemistry, Universidad de Wisconsin, U.S.A.). Para la inmunodetección de la RUBISCO se utilizó una dilución de (1:2000) del antisuero policlonal obtenido en conejo frente a la subunidad L de RUBISCO de *Euglena gracilis*. El anticuerpo fue cedido por el Dr. J. Moreno (Departamento de Bioquímica, Universidad de Valencia). Al día siguiente, se eliminó el anticuerpo con 2 lavados de 5 min y 2 de 15 min con agitación suave en PBS. El anticuerpo secundario conjugado a fosfatasa alcalina (IgG de cabra-antirata en el caso de los anticuerpos monoclonales MAC 236 y MAC 265 e IgG de cabra-anticonejo en el caso de los policlonales de leghemoglobina, componentes I y II de la nitrogenasa y RUBISCO) se preparó diluido 1:1000 en leche desnatada al 5% en PBS y se incubó 2 horas con agitación suave. Posteriormente, se lavó con PBS (2 x 5 min y 2 x 10 min) y seguidamente con TBS pH 7,4 (Tris HCl 10 mM; NaCl 0,15 M; Tween-20 0,3 % y NaN<sub>3</sub> 0,002%) 2 veces durante 10 min. Después se equilibró con Tris HCl 100 mM pH 9,6 durante 5 min. La actividad fosfatasa alcalina se reveló incubando la membrana en Tris HCl 100 mM pH 9,6 que contenía como substratos del enzima, NBT 1 mg/ml (en DMSO 2 % en Tris HCl 100 mM pH 9,6), BCIP 0,05 mg/ml (en dimetilformamida) y Cl<sub>2</sub>Mg 1 mM en oscuridad. Una vez observado la intensidad de las bandas, la reacción se detuvo con agua. Los inmunoblots se escanearon en un densitómetro en escala de grises y los datos fueron integrados usando un software con procesador de imágenes.

#### **2.6.4. Secuenciación de la proteína BLpp y análisis de la secuencia**

La proteína BLpp, visualizada en un gel de poliacridamida, fue transferida utilizando un sistema semiseco a una membrana de PVDF, a 20 V durante 2 horas. La membrana se lavó en metanol durante 5 minutos en agitación suave, y se comprobó la efectividad de la transferencia tiñendo la membrana durante 3 min con una solución Ponceau S o con una tinción de Coomasie (ácido acético 1% (v/v), azul de Coomasie R250 (Sigma) 0,1 % (p/v) en metanol 40% (v/v)) hasta que se vieron las bandas esperadas. La tinción con Coomasie se detuvo con metanol al 50%. Una vez se secó la membrana, la banda identificada fue cortada, para ser secuenciada posteriormente.

En el análisis de los 20 aminoácidos de la región N-terminal de la proteína BLpp, se ha utilizado un secuenciador automático de proteínas “Applied Biosystems Procise-494 protein” en el servicio de proteínas del Centro de Investigaciones Biológicas del CSIC.

La secuencia determinada de aminoácidos se analizó mediante los programas informáticos del NCBI (National Center for Biotechnology Information) y del EBI (European Bioinformatics Institute). La homología entre las secuencias aminoacídicas se estableció por comparación con la base de datos del Genbank empleando el programa BLAST (Altschul *et al.*, 1990).

### **2.6.5. Aislamiento de bacteroides**

Los bacteroides se aislaron a partir de 1 g de peso fresco de nódulos de *Lupinus albus*, según describe Delgado *et al.*, (1992). La homogenización se realizó en mortero a 4 °C con tampón de extracción en una proporción 1:5 (p/v), compuesto por tampón K-fosfato 50 mM pH 7,5; ascorbato sódico 200 mM y 10% PVPP.

El homogeneizado se centrifugó a 250 g y 4 °C durante 5 min, en una centrifuga Beckman J2-21, para eliminar restos nodulares. El sobrenadante de esta primera centrifugación se volvió a centrifugar a 8.000 g a 4 °C durante 10 min. El precipitado de esta centrifugación, donde se encontraban los bacteroides, se lavó dos veces con 1 ml de solución de lavado que contenía tampón K-fosfato 50 mM, sacarosa 300 mM y SO<sub>4</sub>Mg 2 mM. Finalmente, el precipitado se resuspendió en tampón K-fosfato 20 mM, Cl<sub>2</sub>Mg 5 mM, EDTA 1 mM, glicerol 1 M y DTT 1 mM.

Para la cuantificación del contenido proteico del citosol bacteroidal, las muestras se sonicaron con 25 pulsos de 40 s al 50% de intensidad, con un sonicador Vibra-Cell modelo VC-375. Después de verificar por microscopía óptica la ruptura de los bacteroides, se centrifugó a 15.000 g durante 15 min a 4 °C. La concentración proteica se determinó en el sobrenadante como se describe en el apartado 2.6.1.

## **2.7. Estudio del metabolismo del carbono**

### **2.7.1. Medida de las actividades enzimáticas**

#### **2.7.1.1. Extracciones enzimáticas**

Para la medida de las actividades enzimáticas, fosfoenolpiruvato carboxilasa, malato deshidrogenasa y aspartato aminotransferasa, se partió de 0,3 g de nódulos de peso fresco, se homogeneizaron en mortero a 4 °C durante 3 min adicionando 30% de PVPP y una proporción 1:10 (p/v) de tampón Tris HCl 50 mM pH 8,0; Cl<sub>2</sub>Mg 10 mM; DTT 5 mM, conteniendo 25% de etilenglicol. Los extractos se filtraron por 4 capas de gasa y

seguidamente se centrifugaron a 18.000 g durante 20 min a 4 °C, en una centrífuga refrigerada Beckman modelo DU 640.

Los extractos para la valoración de la actividad sacarosa sintasa, se prepararon homogeneizando 0,3 g de nódulos en un mortero a 4 °C con el medio de extracción tampón K-fosfato 50 mM pH 8,0; EDTA 1 mM; etilenglicol 20% en una proporción 1:10 (p/v) y 1/3 de PVPP, se filtraron y centrifugaron a 30.000 g durante 20 min en frío.

Los análisis enzimáticos se realizaron en los sobrenadantes, inmediatamente después de la centrifugación.

### 2.7.1.2. Valoración de las actividades enzimáticas

Las actividades enzimáticas se han valorado por medio de la oxidación o reducción de NAD(P)H/NAD(P)<sup>+</sup> producida en la propia reacción o en una reacción acoplada. La valoración de la actividad en reacciones enzimáticas en las que se produce oxidación o reducción de piridín nucleótidos, se realiza siguiendo la variación de absorbancia a 340 nm debida a la aparición o desaparición de la forma reducida, que presenta un máximo de absorción a dicha longitud de onda, con un coeficiente de extinción molar que es igual para el NADH y el NADPH.

La mezcla de reacción utilizada varió para cada enzima. La reacción se inicia con la adición del extracto. Tras un periodo de incubación, la variación de la absorbancia lineal se registró durante 3 min. Se utilizó un espectrofotómetro Beckman DU 640 termostatzado. En todos los casos se prepararon tres repeticiones y un control sin sustrato para corregir las posibles oxidaciones o reducciones endógenas de NAD(P)H/NAD(P)<sup>+</sup>, según los casos.

El cálculo de las actividades enzimáticas acopladas a una reacción de oxido-reducción NAD(P)H/NAD(P)<sup>+</sup> se realiza según la siguiente ecuación:

$$\text{Actividad } (\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1}) = \frac{(\Delta \text{ D.O. min}^{-1}) V * V_T}{10^{-6} * \epsilon * d * v}$$

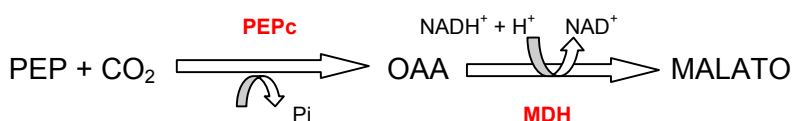
donde,

**Δ.D.O. min<sup>-1</sup>**= incremento medio de D.O. por minuto. **V** = volumen total de la mezcla de reacción (ml). **V<sub>T</sub>** = volumen total de extracto (ml). **ε** = coeficiente de extinción molar de NAD (P) H= 6,22 10<sup>6</sup> cm<sup>2</sup> mol<sup>-1</sup> y de OAA de 1,2 10<sup>6</sup> cm<sup>2</sup> mol<sup>-1</sup>. **d** = ancho de la cubeta= 1 cm. **v** = volumen de extracto añadido a la mezcla (ml).

La actividad enzimática se expresó en μmol/mg proteína/h, a partir de la velocidad de reacción, dada por el espectrofotómetro en μmol min<sup>-1</sup>, y teniendo en cuenta el contenido de proteína soluble nodular.

### 2.7.1.3. Actividad fosfoenolpiruvato carboxilasa

La actividad fosfoenolpiruvato carboxilasa (EC 4.1.1.31) se determinó en el citosol nodular según Lang *et al.*, (1993). La PEPc cataliza la transformación del fosfoenolpiruvato (PEP) a oxalacetato (OAA) el cual es reducido a malato por acción de la enzima malato deshidrogenasa (MDH) mediante la oxidación de NADH, según la siguiente reacción.



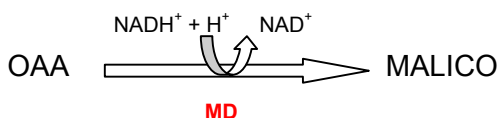
La actividad PEPc, se valoró espectrofotométricamente siguiendo la disminución de absorbancia a 340 nm provocada por la oxidación de NADH en una reacción acoplada a la actividad malato deshidrogenasa endógena. El ensayo, optimizado a partir de la metodología descrita por Lang *et al.*, (1993) se realizó con la siguiente mezcla de reacción en 1 ml: tampón Tris HCl 50 mM pH 8,0; Cl<sub>2</sub>Mg 10 mM; DTT 5 mM; NADH 1 mM; NaHCO<sub>3</sub> 10 mM; PEP 2 mM y MDH 5 U.I..

La reacción se iniciaba añadiendo 300 µl de extracto enzimático del citosol, registrándose la oxidación de NADH a 340 nm a temperatura ambiente, durante 3 min cada 15 s, frente a un blanco que contenía todos los componentes de la mezcla de reacción, excepto el NADH y la muestra.

La actividad enzimática en µmol/mg proteína/h se calculó de la manera descrita en el apartado 2.8.2..

### 2.7.1.4. Actividad malato deshidrogenasa

La actividad malato deshidrogenasa (EC 1.1.1.37) fue determinada en el citosol nodular siguiendo el método descrito por Lang *et al.*, (1993). El análisis de la actividad MDH, en el sentido de reducción del OAA, se basa en la medida de la disminución de la absorbancia a 340 nm debido a la oxidación de NADH, como se muestra en la siguiente reacción.



La mezcla de reacción contenía en 1 ml: tampón K-fosfato 100 mM pH 7,5; NADH 0,2 mM y el extracto enzimático (25 µl). Después de 3 min de incubación a 30 °C, la



reacción se iniciaba añadiendo oxalacetato 0,5 mM, registrándose la oxidación cada 15 s durante 3 min frente al aire.

La actividad MDH se expresó en  $\mu\text{mol}/\text{mg}$  proteína/h.

#### 2.7.1.5. Actividad aspartato aminotransferasa

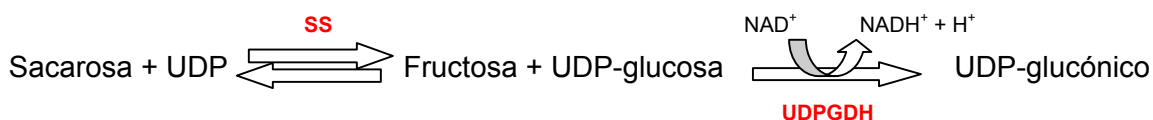
La actividad aspartato aminotransferasa (EC 2.6.1.1) se determinó en el citosol nodular, siguiendo el método descrito por Lang *et al.*, (1993), con ligeras modificaciones. El análisis de la actividad AST en el sentido de utilización de oxalacetato (OAA), se basa en la medida de la disminución de la absorbancia por la desaparición de OAA a 260 nm, como muestra la siguiente reacción:



La mezcla de reacción contenía en 1 ml: tampón Tris HCl 100 mM, pH 7,5; EDTA 0,2 mM; piridoxal 0,1 mM; oxalacetato 1 mM y el extracto enzimático (100  $\mu\text{l}$ ). Después de 5 min de incubación de 30 °C, la reacción comenzaba al añadir glutamato 4 mM. El extracto enzimático del citosol fue diluido a la mitad en su tampón de extracción. Las lecturas se registraron cada 15 s durante 3 min, frente al aire. La actividad AST se expresó en  $\mu\text{mol}/\text{mg}$  proteína/h.

#### 2.7.1.6. Actividad sacarosa sintasa

La enzima sacarosa sintasa (E.C.2.4.1.13) hidroliza la sacarosa en presencia de UDP, produciendo UDP-glucosa que se oxida por la UDP-glucosa deshidrogenasa en presencia de  $\text{NAD}^+$  que se reduce, pudiéndose medir el incremento de absorbancia a 340 nm. Todo el proceso se representa en el siguiente esquema:



La mezcla de reacción, optimizada a partir de la descrita por Morell y Copeland (1985), fue la siguiente: tampón bicina-KOH 100 mM pH 8,5; sacarosa 100 mM; UDP 2 mM; UDPG deshidrogenasa 250  $\mu\text{g}$  y  $\text{NAD}^+$  1,5 mM. La reacción se inicia con la adición de 25  $\mu\text{l}$  de extracto para completar un volumen final de 1 ml, registrándose la reducción de  $\text{NAD}^+$  a 340 nm, a 30 °C cada 15 s, durante 2 min.

La actividad enzimática SS se expresó en  $\mu\text{mol}/\text{mg}$  proteína/hora.

## 2.7.2. Almidón

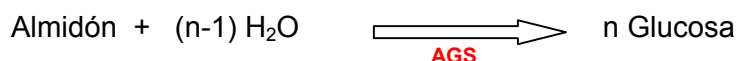
### 2.7.2.1. Extracción

La extracción se llevo a cabo siguiendo el método descrito por Gordon *et al.*, (1992) optimizando las condiciones. Los nódulos se incubaron en etanol al 80% durante 3 min a 100 °C, después de retirar el etanol se dejaron secar a 50 °C. Posteriormente, se pulverizaron en mortero y se resuspendieron en 40 ml de agua destilada/g. La mezcla se hirvió durante 1 hora y fue centrifugada a 3.000 g durante 10 min. En el sobrenadante se determino la cantidad de almidón a 340 nm.

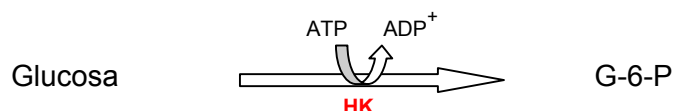
### 2.7.2.2. Determinación de almidón

El principio en el que se basa la determinación se explica según las tres reacciones acopladas siguientes:

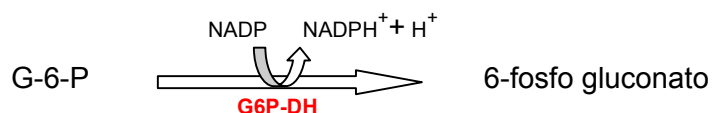
1. El almidón es hidrolizado a glucosa en presencia de la enzima amiloglucosidasa (AGS, Boehringer Mannheim).



2. La glucosa formada es determinada con las enzimas hexoquinasa (HK) y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6P-DH) a un pH 7,5, siendo la glucosa fosforilada a glucosa-6-fosfato (G-6-P) por ATP.



3. En presencia de G6P-DH, la G-6-P es oxidada por el NADP a 6-fosfo gluconato con la siguiente formación de NADPH.



La cantidad de NADH formado en la reacción anterior es estequiométrica con la cantidad de glucosa. El NADH se determina mediante su absorbancia a 340 nm, según la fórmula:

$$\text{Concentración (g. l}^{-1}\text{)} = \frac{V * PM}{\epsilon * d * v * 1.000} * \Delta A$$

donde:

$V$  = volumen total de la reacción (ml).  $v$  = volumen de la muestra (ml).  $PM = 162,1 \text{ g mol}^{-1}$   
 $d$  = paso de luz en cm.  $\epsilon$  = coeficiente de extinción molar de NADH a 340 nm = 6,3.  $\Delta A$  =  
 A muestra - A blanco.

### 2.7.3. Sacarosa

#### 2.7.3.1. Extracción

La extracción se llevo a cabo siguiendo el método descrito por Gordon *et al.*, (1999) optimizando las condiciones. Los nódulos (0,3 g) se homogeneizaron en etanol al 80% (4,8 ml) durante 5 min, se incubaron a 70 °C, 30 min, y se centrifugaron a 18.000 g durante 20 min. Posteriormente el sobrenadante se secó a 65 °C y el residuo obtenido se resuspendió en agua destilada (450  $\mu$ l), para finalmente centrifugarse a 15.000 g durante 10 min. La determinación del contenido de azúcares se realizó en el sobrenadante a 540 nm.

#### 2.7.3.2. Determinación

Para determinar el contenido de sacarosa se siguió el método de Paek, (1988) basado en la reducción enzimática de la sacarosa por medio de la  $\beta$ -fructosidasa y posterior determinación del contenido en azúcares reductores siguiendo el método de Somogyi, (1952), en combinación con el de Nelson, (1994). El extracto nodular se incubó a 55 °C, durante 10 min con la enzima  $\beta$ -fructosidasa (Boehringer Mannheim), después se le añadió el reactivo Somogyi (200  $\mu$ l) y se mantuvo a 100 °C durante 20 min; una vez frío se le añadió el reactivo de Nelson (200  $\mu$ l). La mezcla en un volumen final de 3 ml se midió a una  $\lambda$  de 540 nm.

La cuantificación de la concentración de sacarosa se calculó hallando la diferencia entre la medida de azúcares obtenidos cuando se adiciona la enzima  $\beta$ -fructosidasa y la medida de azúcares reductores inicialmente presentes en el extracto.

### 2.8. Estudio del metabolismo fenólico

Para la determinación de fenoles en tejidos vegetales, se tomaron muestras de hojas (maduras y jóvenes) y nódulos de plantas inoculadas con *Bradyrhizobium sp.* (*Lupinus*) cepa ISLU16, y de plantas tratadas con nitrato (2,5 mM); e inmediatamente fueron congeladas en nitrógeno líquido, liofilizadas y pulverizadas, conservándolas para la extracción y análisis por HPLC de fenoles como describe Becerril *et al.*, (1999).

#### 2.8.1. Extracción de fenoles

Para la extracción de fenoles, se partió de 0,2 g de hojas y 0,15 g de nódulos pulverizados, a los que se añadió HCl 1 M (25 ml). En ambos casos, la extracción se

realizó en reflujo durante 1 hora a 100 °C, interrumpiendo a los 30 min para sonicar la muestra 5 min. El extracto se filtró a través de un papel Watman N° 1, se ajustó el pH a 2,5 y finalmente, se enrasó hasta 50 ml. Una muestra de 2 ml se filtró a través de un filtro de jeringa Nalgene de 0,2 µm que se conservó para la determinación de ácido shikímico. El resto de la muestra (48 ml) se extrajo dos veces con acetato de etilo (20 ml). Las fracciones de acetato de etilo se combinaron y evaporaron mediante un rotavapor. Finalmente, el extracto fue resuspendido en 2 ml de una disolución de ácido fosfórico 3,3 mM pH 2,7 y filtrado a través de un filtro de jeringa Nalgene de 0,2 µm hasta su posterior análisis mediante HPLC.

### 2.8.2. Determinación de fenoles

El análisis del ácido shikímico y de los ácidos hidroxibenzoicos fue realizado usando un sistema de análisis de cromatografía líquida Waters, sistema equipado con dos bombas modelo 150, un inyector plus modelo 717 y un fotodiodo modelo 996, el cual mide un rango de 270-700 nm. La cromatografía es realizada con una columna Water (250 x 4,6 mm; 5 µm tamaño de partícula) Spherisorb ODS-1, protegida con una precolumna (20 x 3,9 mm; 4 µm). El solvente usado para la determinación de shikimato fue una disolución desgasificada de ácido fosfórico 3,3 mM; pH 2,7 a 0,6 ml en régimen isocrático durante 10 min. Para la determinación de ácidos hidroxibenzoicos se utilizaron ácido fosfórico 3,3 mM; pH 2,7 (como solvente A) y metanol de grado HPLC (como solvente B). El gradiente empleado fue el siguiente: 45% de B en A de 0 a 20 min; gradiente lineal de 45 a 100% de B de 20 a 20,5 min; 100% de B de 20,5 a 29 min. El volumen de inyección de la muestra fue siempre 25 µl.

La detección e integración se realizó a 215 nm y los componentes fueron identificados por la comparación de sus tiempos de retención con los correspondientes estándares inyectados solos y/o con la muestra. En nuestro sistema los tiempos de retención (en min) para los compuestos determinados fueron los siguientes: ácido shikímico, 5,8; ácido gálico, 10,93; ácido protocatéquico (PCA) 14,58; ácido gentísico, 16,13; 4-hidroxibenzoico, 19,65; ácido vanílico, 23,62 y ácido sirín gico, 25,9.

El sistema cromatográfico es controlado por un ordenador, usando para el cálculo de las áreas el software Millenium.

## 2.9. Técnicas de microscopía

### 2.9.1. Procesamiento del material vegetal

Para los estudios de microscopía el material vegetal, nódulos y hojas de *Lupinus albus*, fue seleccionado, seccionado (2-3 mm) e inmediatamente procesado tras su separación de la planta.

**2.9.1.1. Inclusión en la resina acrílica LR White**

Los segmentos de hojas y nódulos cortados, se fijaron inmediatamente en glutaraldehído 2,5% en tampón cacodilato sódico 0,05 M, pH 7,4 durante 2 horas a temperatura ambiente. A continuación las muestras se desgasificaron en dos periodos de 10 min y se lavaron tres veces durante 1 hora con tampón cacodilato, manteniéndose a 4 °C toda la noche.

Las muestras se lavaron en tampón cacodilato a temperatura ambiente, se deshidrataron en una serie de etanol (Merck) creciente, a 4 °C, y se infiltraron progresivamente en la resina LR White (London Resin Company), siguiendo el esquema:

1 <sup>er</sup> lavado Tampón cacodilato	1 hora	Temperatura ambiente
2 <sup>o</sup> lavado Tampón cacodilato	1 hora	Temperatura ambiente
3 <sup>er</sup> lavado Tampón cacodilato	noche	4 °C
Etanol 30 %	1 hora	4 °C
Etanol 50 %	1 hora	4 °C
Etanol 70 %	1 hora	4 °C
Etanol 90 %	1 hora	4 °C
Etanol 100 %	1 hora	4 °C
Etanol 100 %	Noche	4 °C
Etanol/LR White (2:1)	4 horas	4 °C
Etanol/LR White (1:2)	4 horas	4 °C
LR White	Noche	4 °C
LR White	2 días (2 cambios/día)	4 °C

Finalmente, las muestras se incluyeron individualmente en cápsulas de gelatina con resina y se taparon procurando que quedara la menor cantidad de aire posible, para su correcta polimerización. Las cápsulas se mantuvieron verticalmente a 60 °C durante 24 horas y a continuación, se dejaron enfriar a temperatura ambiente

**2.9.1.2. Inclusión en la resina hidrofóbica. Araldita**

Las muestras vegetales inmediatamente se fijaron en glutaraldehído 3%, a 4 °C durante 3 horas y se desgasificaron en dos periodos de 10 min. Finalizado el periodo de fijación, se realizaron tres lavados de 1 hora con tampón cacodilato y se mantuvieron a 4 °C durante toda la noche.

A continuación se llevo a cabo una segunda fijación de las muestras en  $\text{OsO}_4$  : tampón cacodilato (1:1) durante 2 horas a 4 °C. El osmio se eliminó mediante tres lavados de 1 hora con tampón cacodilato y se mantuvieron a 4 °C durante toda la noche.

Al día siguiente los tejidos se deshidrataron en una serie creciente de acetona a 4 °C, y finalmente se infiltraron progresivamente en la resina Araldita Durcupan (ACM), a temperatura ambiente, utilizando como intermediario el óxido de propileno, según el esquema:

Acetona 30 %	20 min	4 °C
Acetona 50 %	20 min	4 °C
Acetona 70 %	1 hora	4 °C
Acetona 70 % + acetato de uranilo	2 horas	4 °C
Acetona 90 % (2 cambios)	1 hora	4 °C
Acetona 100 % (2 cambios)	1 hora	4 °C
Acetona 100 %	Noche	4 °C
Óxido de propileno (2 cambios)	30 min	Tª ambiente
Óxido de propileno	1 hora	Tª ambiente
Óxido de propileno / Araldita I (3:1), (2:2), (1:3)	2 horas/cambio	Tª ambiente
Óxido de propileno / Araldita I	2 horas	Tª ambiente
Araldita I (sin el componente polimerizador)	2 horas	50 °C
Araldita I	Noche	50 °C
Araldita II (con el componente polimerizador)	1 hora	50 °C
Araldita II	30 min	50 °C

Finalmente, se realizó la inclusión final de Araldita II, en moldes de goma a 70 °C durante 48 horas para la óptima polimerización de la resina.

### 2.9.2. Microscopía óptica de campo claro

Las secciones, previamente incluidas en resinas LR White o Araldita, se cortaron con el ultramicrotomo REICHERT ULTRACUT S (Leica) provisto con cuchillas de diamante Diatome 45°. En los estudios de microscopía óptica, las observaciones de cortes semifinos (1 µm), de nódulos y hojas se realizaron en un microscopio óptico Zeiss Axiophot con sistema fotográfico integrado. Los cortes montados con unas gotas de agua bidestilada sobre portaobjetos de vidrio tratados con adhesivo de Haupt (Jensen, 1962), fueron teñidos con azul de toluidina al 1%, conteniendo borato sódico (1:1), durante 5-10 min.

### 2.9.2.1. Localización histoquímica de carbohidratos

La localización histoquímica de componentes carbohidratados se realizó mediante la técnica del ácido periódico-base de Schiff (Jensen, 1962) sobre cortes semifinos. Las secciones se incubaron en ácido periódico ( $\text{HIO}_4$ ) al 0,5% (p/v) en agua destilada a temperatura ambiente, durante 30 min. Después de lavar con agua destilada 10 min, se cubrieron con reactivo de Schiff durante 1 hora. A continuación se lavó con agua 1 minuto y se transfirieron a una solución de bisulfito sódico al 2% (p/v) durante 2 min. Finalmente, se lavaron abundantemente en agua destilada durante 10 min.

### 2.9.3. Microscopía electrónica de transmisión

Para los estudios de microscopía electrónica de transmisión se emplearon igualmente secciones incluidas en resinas LR White y Araldita. Las secciones ultrafinas de ~70 nm se realizaron en un ultramicrotomo REICHERT ULTRACUT S (Leica), se recogieron sobre rejillas de cobre o de níquel, de 150-200 ventanas y fueron observadas en un microscopio electrónico STEM LEO910 con una cámara digital integrada Gatan Bioscan (modelo 792).

#### 2.9.3.1. Inmunolocalización

La técnica inmunocitoquímica empleada fue la descrita por Vivo *et al.*, (1989), con ligeras modificaciones. Los cortes ultrafinos (80-70 nm) recogidos en rejillas de níquel de 200 ventanas se incubaron a 37 °C, durante 1 hora sobre una gota de la solución de BSA 20 mg/ml en TBS (BSA-TBS), con objeto de bloquear lugares inespecíficos. Las rejillas, una vez secas se incubaron durante 1 hora a 37 °C sobre 15  $\mu\text{l}$  de una solución del anticuerpo primario diluido en BSA-TBS (dilución 1:1.500 para la leghemoglobina y 1:1.000 para la RUBISCO). Posteriormente, las rejillas se secaron y se lavaron cinco veces, durante 3 min, en BSA 2 mg/ml en TBS, a temperatura ambiente.

Después de secar las rejillas, éstas se incubaron durante 1 hora a 37 °C, con el anticuerpo secundario conjugado a oro coloidal de 15 nm, para la leghemoglobina, y de 5 nm, (IgG de cabra-anticonejo) para la RUBISCO. Los anticuerpos secundarios se diluyeron 1:40 en BSA-TBS 2 mg/ml. Posteriormente, las rejillas se lavaron cinco veces con BSA-TBS 2 mg/ml, durante 3 min a temperatura ambiente. Después se hicieron otros cinco lavados de tres min con una solución de BSA-TBS 2 mg/ml que contenía 0,1% de Triton X-100 (v/v) y finalmente, se realizó otra serie de tres lavados con agua bidestilada esteril.

Las rejillas se dejaron secar totalmente sobre papel de filtro y se tiñeron con acetato de uranilo 2% en agua bidestilada durante 10 min. Una vez secas se volvieron a

teñir con citrato de plomo 0,4% (Reynolds, 1963) durante 1 minuto y se lavaron nuevamente con agua bidestilada.

### **2.9.3.2. Microscopía electrónica de barrido a baja temperatura**

Los nódulos se adhirieron con pegamento Gurr (Compuesto O.C.T.; BDH) a un portaobjetos de aluminio para microscopía de barrido. Inmediatamente se introdujeron en una cámara de nitrógeno líquido *Slush* a  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Las muestras fueron fracturadas por un eje de acero a  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ . A continuación se deshidrataron al vacío a  $-90\text{ }^{\circ}\text{C}$  y se sombrearon con oro para mejorar la conductancia a los electrones. Finalmente, el portamuestras se transfirió a la cámara de observación del microscopio electrónico de barrido Digital Scanning Microscope DSM 960 de Zeiss utilizándose los detectores de electrones secundarios y retrodispersados (B.S.E., *Back Scattered Electrons*) para la observación directa de las muestras.

## **2.10. Clonación de productos de PCR**

Los productos de PCR, una vez eluidos como se describe en el apartado 2.11.1.6, se clonaron utilizando el vector de elevado número de copias pGEM-T Easy (Promega). La ligación se llevo a cabo en un volumen final de 10  $\mu\text{l}$ , durante toda la noche (12-16 horas) a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Para transformar *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  y SURE se empleó el método de electroporación. Las bacterias transformadas se seleccionaron mediante resistencia a antibióticos, en nuestro caso con ampicilina (100  $\mu\text{g/ml}$ ).

Asimismo la selección de los plásmidos que han integrado el inserto de interés, se realizó mediante el sustrato X-galactosa, cromóforo que al precipitar da un color azulado, indicando generalmente la ausencia de inserto. Las bacterias fueron crecidas en placa usando medio LB-ampicilina con 1,5% de agar, a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  de temperatura. Seleccionadas las colonias con el inserto de interés, se aislaron y se amplificaron por PCR (apartado 2.19.).

Posteriormente, se procedió a purificar y secuenciar los plásmidos anteriormente seleccionados en ambas orientaciones. Las secuencias se confirmaron aislando dos clones de cada producto de amplificación.

## **2.11. Transformación bacteriana por electroporación**

### **2.11.1. Preparación de bacterias**

En los experimentos de transformación se han empleado las cepas de *E. coli* DH5 $\alpha$  y SURE. Para obtener bacterias electrocompetentes, primeramente se creció a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  un preinoculo de *E. coli* DH5 $\alpha$  o SURE en 50 ml de medio LB (sin NaCl), con



kanamicina (50 µg/ml) para *E. coli* SURE, entre 14-16 horas con agitación orbital. Se cogió un inóculo y se incubó a 28 °C en LB (DH5α) y LB-Kanamicina (SURE) con agitación (190-200 rpm), hasta alcanzar una DO<sub>600</sub> entre 0,4 y 0,5. El cultivo se mantuvo en hielo de 15 a 30 min y se centrifugó a 4.000 g durante 15 min. El precipitado obtenido se resuspendió en 200 ml de glicerol 10% estéril frío y se volvió a centrifugar a 4.000 g, durante 15 min. Este paso se repitió, con volúmenes decrecientes de glicerol (100 ml, 20 ml y 2 ml) para resuspender las bacterias. Finalmente, se mantuvieron a –80 °C en alícuotas previamente congeladas en nitrógeno líquido.

### **2.11.2. Electroporación**

Para llevar a cabo la electroporación, se cogió 3 µl de la reacción de ligación y se añadió a 200 µl de las células electrocompetentes. La mezcla se añadió a la cubeta de electroporación de 0,2 cm y se colocó en el carril al que se le aplicó un voltaje de 2,2 V durante 4 ms en un electroporador de BIO-RAD. Una vez transformadas las bacterias se cultivaron a 37 °C en 1 ml de medio LB durante 30 min, para finalmente sembrarlas en placas LB-Ampicilina.

### **2.12. Manipulación enzimática**

La manipulación enzimática del ADN con enzimas de restricción, así como con el resto de reacciones enzimáticas llevadas a cabo en el presente trabajo, se hizo según las especificaciones del proveedor de las mismas y protocolos establecidos Sambrook *et al.*, (1989), según se describe en cada apartado.

### **2.13. Electroforesis de ADN**

La electroforesis de ADN genómico se realizó en geles horizontales de agarosa de 0,5 % en tampón TAE pH 7,8 (Tris-acetato 40 mM y EDTA 1 mM). Las muestras de ADN se fraccionaron en el gel en presencia del tampón de carga (glicerol 50%; EDTA 50 mM pH 8,0; azul de bromofenol 0,1% y xylene cyanol 0,1%). Los geles se visualizaron con luz UV en un transiluminador (Spectroline Spectronics Corp., U.S.A), tras una tinción con 0,5 µg/ml de BrEt (Sambrook *et al.*, 1989).

### **2.14. Elución de fragmentos de ADN de geles de agarosa**

Se utilizaron dos sistemas para la elución de fragmentos de ADN de geles de agarosa.

En el primero de ellos se utilizó el kit de “QIAquick” de Qiagen para eluir bandas cortadas a partir del gel de agarosa.

En el segundo caso, la extracción se realizó mediante congelación-descongelación del gel en presencia de fenol. Para ello, la banda de agarosa con el fragmento de interés se cortó, se transfirió a un tubo al que se le añadió un volumen de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) en una proporción de 1 mg/ml y se trituró. El homogeneizado se mantuvo a -80 °C durante 3 min y posteriormente se centrifugó a 15.000 g, durante 15 min. Se recogió la fase acuosa y se realizó, por dos veces, el mismo paso de fenolización. Finalmente el ADN se precipitó con 1/10 del volumen de acetato sódico 3 M pH 5,3 y dos volúmenes de etanol a -20 °C, durante 16 horas.

## 2.15. Extracción de ADN genómico

*Bradyrhizobium* sp. (*Lupinus*) ISLU16 fue crecida a 28°C en medio TY hasta alcanzar una D.O. de 600 nm. Las bacterias seguidamente se centrifugaron a 4.000 g durante 10 min, para separar las células del medio. El precipitado se resuspendió suavemente en tampón TE, pH 8,0 (Tris HCl 10 mM y EDTA 1mM). Posteriormente se le añadió SDS 10% (0,5 ml) y de proteinasa K (20 mg/ml), y se incubó a 37 °C durante 1 hora. Transcurrido el tiempo se le añadió NaCl 5 M (1,8 ml) y solución CTAB 10% en NaCl 0,7M (1,5 ml), y nuevamente se incubó a 65°C durante 20 minutos. Después se añadió 1 volumen de cloroformo:isoamil alcohol (24:1) y se centrifugó a 5.000 g durante 10 min, a temperatura ambiente para separar las fases, en una microcentrífuga Eppendorf modelo 5415D.

La fase acuosa se transfirió a otro tubo junto con un volumen igual de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1), y se centrifugó 10 min a 5.000 g. El ADN se precipitó con 0,6 volúmenes de isopropanol, se recogió mediante centrifugación y el precipitado se lavó con 1 ml de etanol al 70%, y se resuspendió en TE (4 ml).

La cuantificación del ADN se llevó a cabo en un espectrofotómetro Beckman (DU640). Las concentraciones se calcularon tras la determinación del espectro de absorción, utilizándose valores de  $E_{260,0,1\%}=21$ .

## 2.16. Extracción de ARN

La extracción de ARN total de nódulos (100-300 mg) se realizó según (Goormachtig *et al.*, 1995).

Los nódulos se homogeneizaron en presencia de N<sub>2</sub> líquido hasta obtener un polvo fino. A continuación se añadió 0,5 ml del tampón de extracción (Tris HCl 0,2 M pH 7,5; LiCl-DEPC 0,1 M; EDTA-DEPC 5 mM y SDS 1%) y 0,5 ml de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (24:24:1) y tras su mezcla se centrifugó a 18.000 g durante 5 min a 4 °C. A la

fase acuosa obtenida, se le añadió un volumen de cloroformo:alcohol isoamílico y se centrifugó a 18.000 *g* durante 5 min.

El ARN se precipitó con 1 volumen de LiCl 6 M y se mantuvo durante al menos 4 horas en hielo. Seguidamente se centrifugó a 18.000 *g* durante 30 min a 4 °C. Al precipitado se le añadió 1 ml de LiCl 3 M para lavarlo y se centrifugó durante 10 min a 18.000 *g*. Una vez decantado el precipitado se resuspendió en H<sub>2</sub>O bidestilada tratada con dietilpirocarbonato (DEPC) y se precipitó con 0,1 volúmenes de acetato sódico 3 M, pH 4,8 y 2 volúmenes de etanol absoluto de 12-16 horas, a -20 °C. A continuación se centrifugó a 18.000 *g* durante 30 min a 4 °C. Y finalmente el precipitado se lavó con etanol al 70% a 18.000 *g* durante 5 min. El ARN precipitado se resuspendió en agua bidestilada tratada con DEPC y una vez cuantificado espectrofotométricamente, se visualizó en un gel de ARN mediante electroforesis.

La extracción del ARN bacteriano de *Bradyrhizobium* sp. (*Lupinus*) cepa ISLU16 se realizó utilizando el Kit “RNeasy” de Quiagen, siguiendo el protocolo de aislamiento de ARN total de bacteria recomendado por el fabricante.

## 2.17. Purificación de ADN plasmídico

Para la purificación de plásmidos a pequeña escala (1 ml) a partir de cultivos bacterianos se utilizó el método de lisis alcalina descrito por Sambrook *et al.*, (1989).

Para las purificaciones a mayor escala (a partir de 200 ml de medio de cultivo), se utilizó el Kit “Plasmid Midi Kit” de Quiagen, siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante.

## 2.18. Reacción de amplificación por PCR del ADN genómico

La amplificación de ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) ha sido realizada en un termociclador (GeneAmp PCR System 2440, Perkin Elmer).

Para la obtención de la secuencia de la región codificante, la reacción se realizó en un volumen final de 50 µl, siendo las concentraciones finales de los reactivos: 40 mM de Tris HCl pH 9,3; 15 mM KOAc; 0,02% Triton X-100; 10 mM de cada uno de los nucleótidos (dATP, dCTP, dGTP, dTTP); 1,1 mM de Mg (OAc)<sub>2</sub>; 0,2 µM de cada uno de los cebadores de la mezcla, cebadores externo e interno del adaptador (AP1 y AP2) y cebadores específicos del gen de interés (apartado 1.3.), 6 ng de ADN molde, 5% de DMSO y 5 unidades de la polimerasa termoestable procedente de *Thermus thermophilus* “*Advantage Genomic Polymerase Mix*” de Clontech.

El programa de amplificación primaria fue una desnaturalización inicial de 5 segundos (s) a 99 °C, seguido de 7 ciclos de desnaturalización de 2 s a 94 °C, acoplamiento y extensión de 3 min a 72 °C y a continuación 37 ciclos de

desnaturalización de 25 s a 94 °C, acoplamiento y extensión de 3 min a 67 °C más una extensión adicional de 7 min a 67 °C.

El programa de amplificación secundaria consistió en: 5 segundos (s) a 99 °C, seguido de 7 ciclos de desnaturalización de 2 s a 94 °C, acoplamiento y extensión de 3 min a 72 °C y a continuación 20 ciclos de desnaturalización de 25 s a 94 °C, acoplamiento y extensión de 3 min a 67 °C más una extensión adicional de 7 min a 67 °C.

Las reacciones de amplificación se verificaron cargando 5 µl de la misma en un gel de agarosa del 0,8% en tampón TAE conteniendo 0,5% de bromuro de etidio. Como marcadores de masa se emplearon los fragmentos del plásmido pUC 18 resultantes de la digestión con la enzima de restricción *SauIII* A. Tras la electroforesis, los fragmentos se visualizaron con luz UV.

## **2.19. Reacción de amplificación por PCR de colonias**

La amplificación mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) ha sido realizada en un termociclador (GeneAmp PCR System 2440, Perkin Elmer). Para chequear las colonias crecidas tras la transformación, la reacción se realizó en un volumen final de 20 µl, siendo las concentraciones finales de los reactivos: 25 mM de la mezcla de nucleótidos (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 1,5 mM de Mg Cl<sub>2</sub>, 0,5 µM de los cebadores universales en el sentido directo e inverso del bacteriófago M13, 0,2 µg de ADN molde, y 0,6 unidades de la polimerasa *Taq* (Roche).

El programa de amplificación fue una desnaturalización inicial de 2 min a 94 °C, seguida de 5 ciclos de desnaturalización de 30 s a 94 °C, acoplamiento de 30 s a 54 °C y extensión de 45 s a 72 °C y a continuación 20 ciclos de desnaturalización de 30 s a 94 °C, acoplamiento de 30 s a 58 °C y extensión de 45 s a 72 °C más una extensión adicional de 7 min a 72 °C.

Las reacciones de amplificación se verificaron cargando 5 µl de la misma en un gel de agarosa del 0,8% en tampón TAE conteniendo 0,5% de bromuro de etidio. Como marcadores de masa se emplearon los fragmentos del plásmido pUC 18 resultantes de la digestión con la enzima de restricción *SauIII* A. Tras la electroforesis, los fragmentos se visualizaron con luz UV.

## **2.20. Rastreo del ADN genómico**

Con objeto de determinar la secuencia de la región codificadora del gen, se empleó el Kit “Universal Genome Walker” (Clontech), mediante el cual el ADN genómico (0,1 µg/µl) de la bacteria se somete a cinco digestiones independientes, con las enzimas de corte frecuente que dan extremos romos *Dra* I, *EcoR* V, *Pvu* II, *Sca* I y *Stu* I. A

continuación se ligan a los extremos de cada ADN digerido, los adaptadores (*Genome Walker* adaptor) suministrados con el Kit.

Los adaptadores servirán posteriormente como cebadores (AP1 y AP2) para realizar la amplificación de las secuencias de interés, junto con los cebadores específicos (*n1-n4*, apartado 1.4.) de la secuencia genómica que se desea amplificar. Utilizando la mezcla de cebadores descritos, y una vez construidas las librerías, se llevaron a cabo dos amplificaciones sucesivas. La primera amplificación usó el cebador externo del adaptador AP1 y un cebador específico del gen (*n1-n4*). La PCR inicial es utilizada para una segunda amplificación (PCR “nested”), usando el cebador interno del adaptador AP2 y el cebador específico del gen.

Los productos obtenidos de las reacciones de PCR fueron visualizados mediante electroforesis en geles de agarosa 0,8% con BrEt al 0,5%.

## 2.21. Síntesis de sondas de ARN

Las sondas de ARN, se sintetizaron mediante transcripción “*in vitro*”, en presencia de digoxigenina (Roche).

Para las reacciones de transcripción se ha utilizado como molde el plásmido Pk<sub>nm</sub> (fig. 40). Previamente el plásmido ha sido linearizado con la enzima *SacII*. La transcripción ha sido catalizada por la enzima SP6 polimerasa (Roche), siguiendo las sugerencias del fabricante.

La sonda homóloga de ARN se calentó a 95 °C durante 5 min, antes de ser añadida a la solución de hibridación, para conseguir su desnaturalización.

## 2.22. Análisis *Southern blot*

### 2.22.1. Electroforesis y transferencia

El ADN genómico (15 µg) obtenido según se describe en el aptdo. 2.15., se digirió, en un volumen final de 60 µl, con 75 unidades de las tres enzimas de restricción *BamH I*, *EcoR I* y *Hind III* (Amersham Pharmacia Biotech) durante 12-16 horas a 37 °C. Los ADN digeridos se separaron por electroforesis en un gel horizontal de agarosa (1,2%) a un voltaje de 1 V/cm durante 12 horas en tampón TAE, utilizando como marcadores de masa molecular los productos de digestión del fago λ, digeridos con *Hind III* y *EcoR I*. Posteriormente el gel se tiñó con bromuro de etidio (0,5 µg/ml) durante 45 min en agitación suave, para visualizar la separación de los fragmentos y se lavó en agua bidestilada durante una hora para eliminar el BrEt.

### 2.22.2. Hibridación

El ADN se transfirió por capilaridad en condiciones alcalinas a la membrana de nylon cargada positivamente Hybond-N (Amersham Pharmacia Biotech), según el método descrito por Sambrook *et al.*, (1989). Previamente el gel se incubó en una solución de ácido clorhídrico 250 mM durante 10 min. Seguidamente se incubó en la solución de desnaturalización (NaOH 0,5 M y NaCl 1,5 M) mediante dos lavados de 30 min. A continuación se equilibró en dos periodos de 15 min en la solución de neutralización a pH 9,0 (Tris HCl 0,5 M pH 7,5 y NaCl 3 M). El ADN se transfirió durante toda la noche a membrana usando el tampón SSC 20X (SSC, pH 7,0: NaCl 150 mM y citrato sódico 15 mM). Y finalmente se fijó covalentemente a la membrana por irradiación con luz ultravioleta en un “UV crosslinker” de Stratalinker.

La membrana fue prehibridada e hibridada a 50 °C en condiciones de hibridación muy restrictivas, para impedir hibridaciones con otras secuencias homólogas, siguiendo el protocolo descrito por Sambrook *et al.*, (1989). La prehibridación se realizó incubando la membrana en una solución de prehibridación (formamida desionizada 50%; SSC 5X 25%; solución de bloqueo 20% (Roche); lauroylsarcosina 0,1% y SDS 0,2%) de 30 min a dos horas. A continuación la sonda de ARN marcada con digoxigenina, cuya síntesis se describe en el apartado 2.21., se incubó con la membrana en la solución de hibridación (formamida desionizada 50%; SSC 5X 25%; solución de bloqueo 20% (Roche); lauroylsarcosina 0,1% y SDS 0,2%) durante 12-16 horas.

Una vez finalizada la hibridación, la membrana se lavó: dos veces en SSC 2X, SDS 0,1% a temperatura ambiente durante 5 min, en SSC 0,5X, SDS 0,1% a 68 °C durante 15 min. Y un último lavado menos severo en solución de lavado (ácido maleico 0,1 M pH 7,5, NaCl 0,15 M; Tween-20 0,3%) a 20 °C de 1-5 min.

Posteriormente la membrana se incubó, previamente bloqueada con solución de bloqueo (DIG Luminescent Detection, Roche) contenida en tampón maleico, con el anticuerpo anti-digoxigenina (Roche), diluido 1:10000, durante 30 min a 20 °C. Finalmente, el anticuerpo se lavó 30 min con la solución de lavado y se preparó para el revelado equilibrándose con el tampón de detección (Tris HCl 0,1 M pH 9,5 y NaCl 0,1 M).

La detección de las señales de hibridación por reacción de luminiscencia del revelado se realizó mediante el Kit DIG Luminescent Detection (Roche). Y por exposición de las membranas a películas autorradiográficas (Kodak X-OMAT-AR).

## **2.23. Análisis Northern blot**

### **2.23.1. Electroforesis y transferencia**

La electroforesis de ARN total se realizó en condiciones desnaturalizantes según la técnica descrita por Sambrook *et al.*, (1989). Las muestras de ARN total (5 µg) se desnaturalizaron a 55 °C durante 15 min en presencia de tampón de carga para geles de ARN (formamida desionizada 39%; MEN 0,97X; formaldehído 4,1% y BrEt 0,06 µg/ml). El ARN se fraccionó en geles de agarosa al 1,5% y formaldehído al 6%, utilizando como electrolito el tampón MEN 1X pH 7,0 (MOPS 20 mM; acetato sódico 5 mM y EDTA 1 mM) y aplicando una corriente de 7 V/cm durante 2 horas. Junto con las muestras se cargó ARN del virus del mosaico del tabaco (CMV) de peso molecular conocido como marcador. Una vez comprobada la separación de los fragmentos, el ARN se transfirió por capilaridad a membrana de nylon Hybond-N (Amersham Pharmacia Biotech), en tampón SSC 20X, según el método descrito Sambrook *et al.*, (1989) y se fijó a la membrana por irradiación con luz UV en un "UV crosslinker" de Stratalinker.

### **2.23.2. Hibridación**

La prehibridación se llevo a cabo en agitación a 65 °C durante 1-2 h. en la solución de prehibridación. Seguidamente la membrana se incubó con la sonda homóloga de ARN marcada con digoxigenina, previamente desnaturalizada a 95 °C, 5 min, contenida en la misma solución de hibridación. La hibridación ARN-ARN se realizó de 12-16 h. a 65 °C. Una vez retirada la sonda de la membrana, se procedió a los lavados, dos primeros de 5 min en SSC 2X, SDS 0,1% a temperatura ambiente, dos segundos lavados de 15 min a 65 °C en SSC 0,1X, SDS 0,1% y un último lavado menos restrictivo en solución de lavado de 1-5 min a 20 °C.

Posteriormente la membrana se incubó, previamente bloqueada con solución de bloqueo (DIG Luminescent Detection, Roche) contenida en tampón maleico, con el anticuerpo anti-digoxigenina (Roche), diluido 1:10000, durante 30 min a 20 °C. Finalmente el anticuerpo se lavó 30 min con la solución de lavado y se preparó para el revelado equilibrándose con el tampón de detección.

La detección de las señales de hibridación por reacción de luminiscencia del revelado se realizó mediante el Kit DIG Luminescent Detection (Roche). Y por exposición de las membranas a películas autorradiográficas (Kodak X-OMAT-AR).

## **2.24. Secuenciación de ADN y análisis de las secuencias**

La secuenciación de ADN se ha realizado en un secuenciador ABI PRISM 377 (Applied Biosystems, Perkin-Elmer), en el servicio de Secuenciación Automática de ADN

(SSAD) del Centro de Investigaciones Biológicas del CSIC. Como cebadores se emplearon los oligonucleótidos universales en el sentido directo e inverso del bacteriófago M13 y los correspondientes a cada una de las secuencias de los fragmentos de interés.

Las secuencias determinadas de ADN se analizaron mediante los programas informáticos del SDSC (San Diego Supercomputer Center), del NCBI (National Center for Biotechnology Information) y del EBI (European Bioinformatics Institute).

La homología entre las secuencias se estableció por comparación con la base de datos del *Genbank* empleando el programa BLAST, asimismo mediante este programa se obtuvo la secuencia aminoacídica de la proteína BLpp, a partir de la secuencia codificante de su gen

## **2.25. Predicción del modelo estructural de BLpp**

El reconocimiento de los dominios de la proteína BLpp esta basado en los resultados de la predicción estructural obtenidos mediante los programas 3D-PSSM (Kelley *et al.*, 2000) y Libellula (Juan *et al.*, 2003). Asimismo el hipotético dominio transmembrana  $\beta$ -barrel correspondiente a la cadena P de porina específica de sacarosa (*Sucrose-specific porin*) fue identificado según la clasificación SCOP, además de la identificación de un “posible” sitio de unión a lipoproteínas de membrana de procariotas mediante la base de datos PROSITE (<http://us.expasy.org/tools/scanprosite>)

## **2.26. Hibridación *in situ* ultraestructural**

### **2.26.1. Preparación de los cortes**

Los experimentos de hibridación *in situ* se realizaron en cortes ultrafinos de nódulos incluidos en LR-White, sobre rejillas de níquel con película de piodoformo en dicloroetano (0,4%, p/v), según la técnica descrita por González-Melendi *et al.*, (2002). Las secciones se incubaron con una solución de proteinasa K (1 $\mu$ g/ml) en un tampón apropiado (EDTA 0,05 M; Tris ClH 0,1 M pH 8,0) durante 1 hora a temperatura ambiente. Previo a su utilización, la solución de proteinasa K se estabilizó a 37 °C durante 1-2 horas. Finalmente, las rejillas se lavaron 3 veces durante 10 min en el tampón utilizado para diluir la proteinasa K y en agua bidestilada, y se dejaron secar hasta el momento de la hibridación.

### **2.26.2. Hidrólisis alcalina de la sonda**

La sonda se hidrolizó para optimizar su hibridación, partiendo de 50  $\mu$ l de ésta, se añadieron 30  $\mu$ l de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0,2 M y 20  $\mu$ l de NaHCO<sub>3</sub> 0,2 M, y se incubó a 60 °C durante 38 min para producir fragmentos de aproximadamente 200 pares de bases. El tiempo de hidrólisis se calculó aplicando la siguiente fórmula:



$$\text{Tiempo (min)} = \frac{\text{Li-Lf}}{\text{K} * \text{Li} * \text{Lf}}$$

donde:

**Li**= longitud inicial (kb). **Lf**= longitud final (kb). **K**= 0,11.

La reacción se detuvo por adición de 3 µl de acetato sódico 3 M pH 6,0 y 5 µl de ácido acético glacial. A continuación, la sonda se precipitó con 0,1 volúmenes de acetato sódico 3M pH 4,8; 10 µg de ARNt de levadura (Merck) y 2,5 volúmenes de etanol absoluto durante 12 hora a -20 °C. El sedimento se lavó dos veces con 200 µl de etanol 70% y se resuspendió en 10 µl de agua bidestilada (DEPC).

### 2.26.3. Hibridación

Los cortes ultrafinos se incubaron toda la noche a 50 °C en cámara húmeda con una solución de hibridación compuesta por: 200 ng/µl de sonda marcada con digoxigenina, 1µg/µl de ARN no marcado diferente a la sonda, formamida desionizada al 50 %, sulfato de dextrano al 10%, EDTA 1 mM, NaCl 300 mM y PIPES 10 mM pH 8,0. Una vez producida la reacción de hibridación, las rejillas se lavaron con tampón PBS durante 5 min y con SSC 0,1X, tres veces durante 5 min. Las rejillas, se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente sobre una solución del anticuerpo primario. Previamente, el anticuerpo obtenido en ratón frente a digoxigenina había sido diluido 1:5000 en BSA al 3% en PBS. A continuación, se eliminó con tres lavados de 2 min en PBS. El revelado del híbrido ARN/ARN, se llevó a cabo mediante la incubación de las rejillas con la solución (1:25 en PBS) del anticuerpo secundario (anti-ratón, conjugados con partículas de oro de 10 nm) durante 45 min a temperatura ambiente. A continuación, se hicieron tres lavados consecutivos con PBS seguidos de otros tres de 2 min con agua bidestilada estéril. Finalmente, el tejido se secó y se tiñó con acetato de uranilo y citrato de plomo, como se ha descrito en el apartado 2.9.3.1.

### 2.27. Análisis estadístico de los resultados

Los datos obtenidos fueron analizados mediante el programa SPSS 11.5.1., con un análisis de varianza ANOVA de un factor. Las diferencias significativas entre tratamientos fueron determinadas mediante el test de mínima diferencia significativa (LSD,  $P \leq 0,05$ ). Los valores de las gráficas son la media de 3 réplicas de cada tratamiento comparadas en diferentes experimentos.



## *RESULTADOS*



## 1. Efecto del glifosato sobre diferentes parámetros fisiológicos en plantas de *Lupinus albus* L. cv. Multolupa

### 1.1 Sintomatología y crecimiento de *Lupinus albus* L. cv. Multolupa

En el estudio del efecto del glifosato sobre el crecimiento de la planta *Lupinus albus* en simbiosis con *Bradyrhizobium* sp. (*Lupinus*) se empleó la cepa ISLU16.

Las plantas inoculadas fueron tratadas con el herbicida a las 5 semanas de la siembra y se crecieron como se describe en el apartado 2.1 de Materiales y Métodos. Las dosis de glifosato utilizadas fueron: 0; 1,25; 2,5; 5 y 10 mM. Estas dosis corresponden a la dosis comercial recomendada y sucesivas diluciones a la mitad. Las muestras fueron recogidas tras estar expuestas al herbicida durante tiempos cortos: 1, 2 y 3 días y tiempos largos: 4, 5, 7 y 12 días. Inmediatamente después de la recogida del material vegetal, se analizó el peso fresco y seco de las hojas, raíces y nódulos.

Los síntomas de la aplicación de glifosato se manifiestan muy rápidamente. A las 24 horas, tras la aplicación del herbicida, la parte aérea presentaba claros síntomas de senescencia precoz y necrosis foliar, mostrándose una flaccidez de los folíolos a partir de la dosis 2,5 mM como consecuencia de la pérdida de turgencia en las hojas. Esta sintomatología fue haciéndose más patente conforme el tiempo y la dosis eran mayores. Tras 12 días de tratamiento con la concentración mínima aplicada 1,25 mM y en concentraciones superiores, la parte aérea presentaba síntomas de estrés más acusados, observándose amarillamiento foliar y enrollamiento de los bordes en hojas jóvenes. Además se podía apreciar una marcada clorosis en hojas de nueva formación (fig.9).



Figura 9: Sintomatología de hojas de plantas de *Lupinus albus* L. cv. Multolupa inoculada con *B. sp.* (*Lupinus*) ISLU16, 12 días después de la aplicación del herbicida glifosato (1,25 mM). Hoja joven (izquierda) y hojas maduras (centro y derecha).

A los 3 días de cultivo, se observó en los distintos experimentos un descenso en la absorción de la solución de riego en las plantas tratadas con mayor concentración de glifosato con respecto al control.

En los experimentos en tiempo de exposición cortos (1 día) al herbicida, los parámetros físicos: peso fresco de hojas, raíces y nódulos, o no se modificaron o bien sufrieron una ligera disminución sin ninguna diferencia significativa.

Por el contrario en los experimentos con tiempo de exposición mayor, el glifosato causó una inhibición en el crecimiento de los nódulos. A los 5 días, como se muestra en la gráfica (fig. 10A), el peso fresco nodular disminuye en un porcentaje del 32% y 25% a las concentraciones de 5 y 10 mM respectivamente, en relación al control. Asimismo, a los 7 días de tratamiento el porcentaje de inhibición permaneció en un 26% a 5 mM y 28% a la mayor concentración aplicada (10 mM).

Por tanto, a medida que aumenta el tiempo de exposición, el desarrollo nodular se ve afectado especialmente en altas concentraciones 5 mM y 10 mM. Este descenso en el peso nodular no es consecuencia de una reducción en el número de nódulos sino un efecto sobre el desarrollo a lo largo del tiempo de estudio, siendo este significativamente menor a partir de la concentración 5 mM de glifosato.

En las plantas control el peso seco de la raíz aumenta con el desarrollo de la plantas. En las plantas tratadas con el herbicida se observó que este incremento fue menor al producido en sus respectivos controles (fig. 10B), presentando diferencias significativas en las dosis 5 y 10 mM con una inhibición del 60% y 70% respectivamente, al mayor tiempo de estudio en estos experimentos, 7 días.

El peso fresco de la parte aérea resultó igualmente afectado a altas concentraciones. Con 5 días de exposición, como se indica en la gráfica 10C, el desarrollo foliar experimentó una bajada del 23% y del 28% a 5 y 10 mM, de igual forma a los 7 días se observó una inhibición de hasta el 66% a 10 mM.

La relación PF/PS (peso fresco/peso seco), a pesar de no ser el parámetro que mejor muestra el estado hídrico de la planta, proporciona información del grado de alteración del contenido hídrico de los tejidos alterados por el glifosato. Los valores de la relación PF/PS en los controles son similares, sin embargo el efecto del herbicida es progresivo y significativamente menor a partir de 5 mM desde 5 días (datos no mostrados).

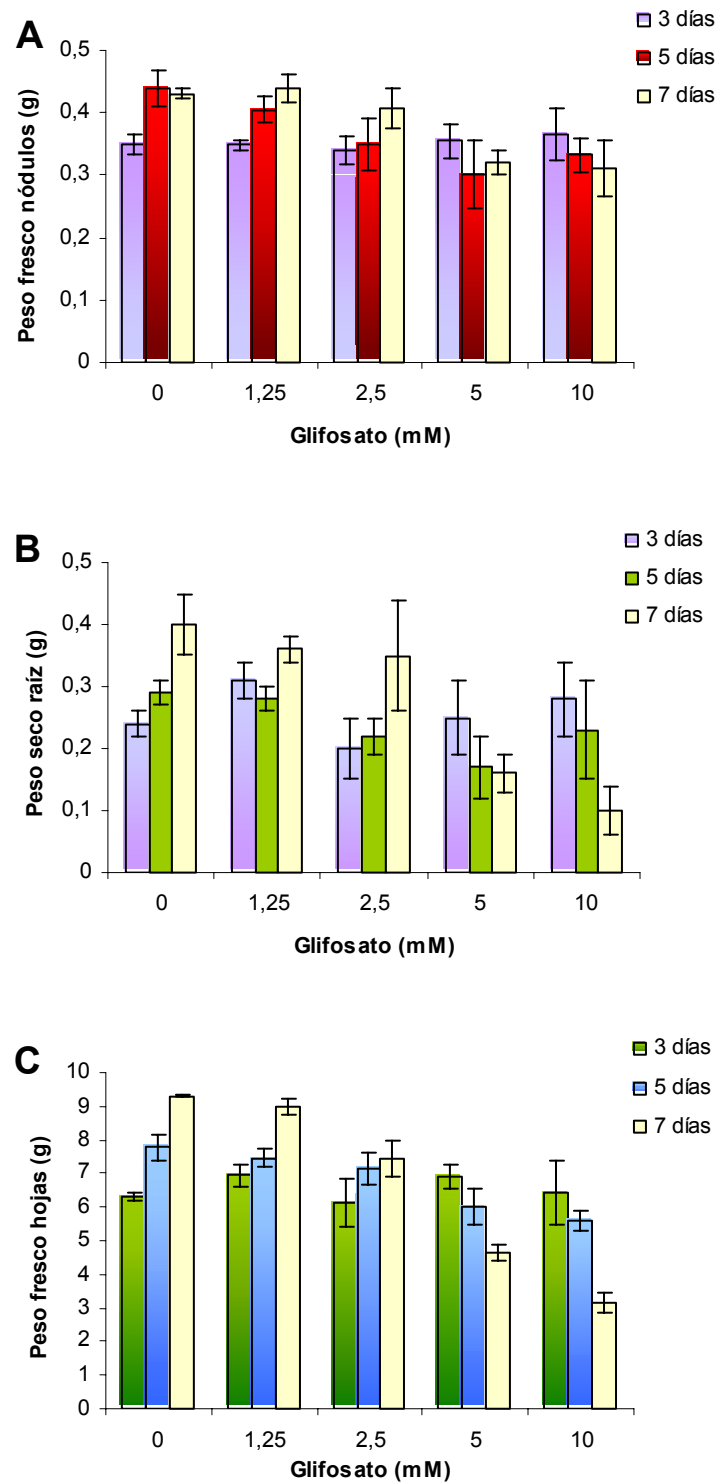


Figura 10: Parámetros de crecimiento de las plantas de *L. albus* sometidas a concentraciones crecientes de glifosato durante 3, 5 y 7 días. A) Peso fresco de nódulos (g). B) Peso seco en raíz (g). C) Peso fresco en hojas (g). Los valores son la media de 6 plantas de cada concentración. Las barras indican el error estándar.

## 1.2. Efecto del glifosato sobre la actividad fijadora de nitrógeno

En la figura 11 se muestra la actividad nitrogenasa de *Lupinus albus*. Los valores de las gráficas son la media de 6 réplicas de cada tratamiento comparadas en diferentes experimentos. Con 1 día de exposición, aunque los parámetros físicos no mostraron diferencias significativas con respecto al control, sin embargo, el análisis de la actividad nitrogenasa ( $\mu\text{mol etileno planta}^{-1}$ ) y de la actividad nitrogenasa ( $N_{asa}$ ) específica ( $\mu\text{mol etileno g}^{-1}$  nódulo) mostraban una bajada drástica de la actividad del 33% en ambos casos, con sólo concentraciones de 1,25 mM presentando diferencias significativas a partir de esta concentración (fig. 11). La actividad  $N_{asa}$  y la actividad  $N_{asa}$  específica se redujeron hasta un 49% y 64% respectivamente cuando la concentración fue de 5 mM.

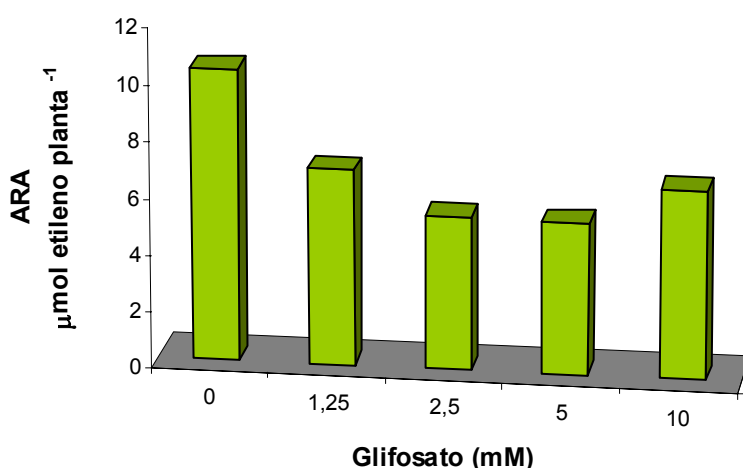


Figura 11: Actividad Nitrogenasa en plantas sometidas a distintas concentraciones de glifosato durante 1 día. Los valores son la media de 6 plantas de cada concentración.

En la figura 12A y B se expresa la actividad reductora de acetileno (ARA) por planta y por g de nódulo, de 3, 5 y 7 días. El tratamiento con el herbicida provocó una drástica disminución del ARA de las plantas, como se indicó ya anteriormente. A los 3 días de tratamiento el descenso fue del 40% con la menor concentración (1,25 mM), una disminución del 87% con 2,5 y 5 mM hasta casi una inhibición total (97%) con la dosis 10 mM.

De la misma forma, la actividad  $N_{asa}$  y la actividad  $N_{asa}$  específica en 5 y 7 días bajan hasta un 84% y 91% en concentraciones de 5 mM, y acaban inhibiéndose totalmente en las dosis más altas (10 mM), desde los 5 días de exposición.



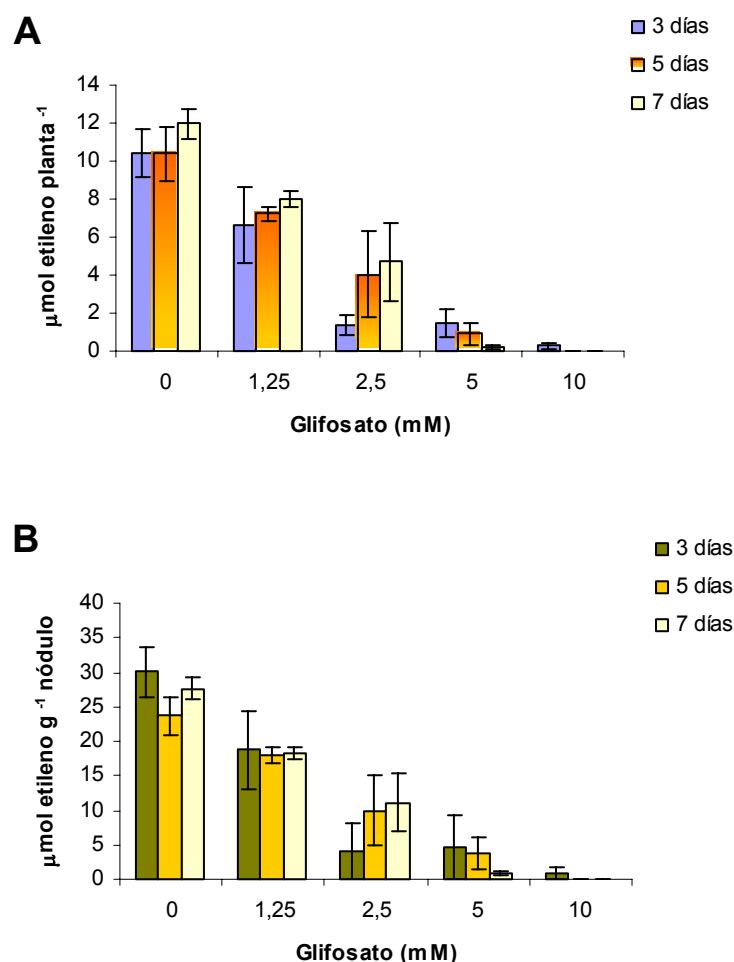


Figura 12: Medida del ARA en plantas tratadas con glifosato a 3, 5 y 7 días de exposición. A) Actividad nitrogenasa por planta ( $\mu\text{mol etileno planta}^{-1}$ ). B) Actividad nitrogenasa específica ( $\mu\text{mol etileno g}^{-1} \text{nódulo}$ ). Los valores son la media de 6 réplicas de cada concentración. Las barras indican el error estándar.

## 2. Efecto del glifosato sobre el crecimiento de *Bradyrhizobium sp* (*Lupinus*)

El estado óptimo del *Bradyrhizobium* es decisivo en el establecimiento del sistema simbiótico; de aquí que para ahondar en el estudio del efecto sobre la simbiosis, analizaremos el crecimiento en vida libre del microsimbionte en presencia de glifosato.

Se estudió el efecto del glifosato sobre dos cepas: ISLU16 y L750, ambas han demostrado en numerosos experimentos ser las más eficaces en cuanto a su capacidad fijadora de nitrógeno (datos no publicados).

Para testar la tolerancia de las cepas ISLU16 y L750 se tuvo en cuenta que en los primeros experimentos realizados, en los que las bacterias se cultivaron con las mismas concentraciones ensayadas en la planta (1,25; 2,5; 5 y 10 mM), la inhibición del crecimiento fue total en todas las concentraciones. A partir de aquí, se ensayaron

concentraciones menores en sucesivas diluciones a la mitad desde 250  $\mu\text{M}$  hasta 7,81  $\mu\text{M}$  (250, 125, 62,5, 31,25, 15,62 y 7,81  $\mu\text{M}$ ).

El crecimiento de las dos cepas se vio severamente afectado por el glifosato, como indican las gráficas, en ambas se muestra una reducción progresiva conforme la concentración del herbicida en el medio era mayor, sin embargo, mientras que para la cepa ISLU16 la inhibición del crecimiento fue total a partir de la concentración 250  $\mu\text{M}$  (fig. 13B), en la cepa L750 el crecimiento se inhibía a una concentración de 125  $\mu\text{M}$  (fig. 13A).

Estos resultados indican que existe una pequeña variabilidad entre las cepas de *Bradyrhizobium* en cuanto a la sensibilidad al glifosato, ya que la cepa L750, a pesar de tener mayor capacidad de fijación, resultó ser más sensible que la ISLU16 (fig. 13C y D).

La tolerancia de las distintas cepas al herbicida, se utilizó como criterio para inocular plantas de *Lupinus* que posteriormente se trataron con el herbicida.

La cepa elegida, ISLU16, por su mayor tolerancia, también se vio afectada en su velocidad de crecimiento por el glifosato, como se muestra en la figura 13B. La tasa de crecimiento, determinada como unidades formadoras de colonias (UFC), se inhibió totalmente desde la concentración 31,25  $\mu\text{M}$ . A partir de aquí, cabe señalar que el herbicida afectó en mucho la viabilidad, reduciéndose hasta en un 50% con la menor concentración incubada, 7,81  $\mu\text{M}$  de herbicida (fig. 13D).

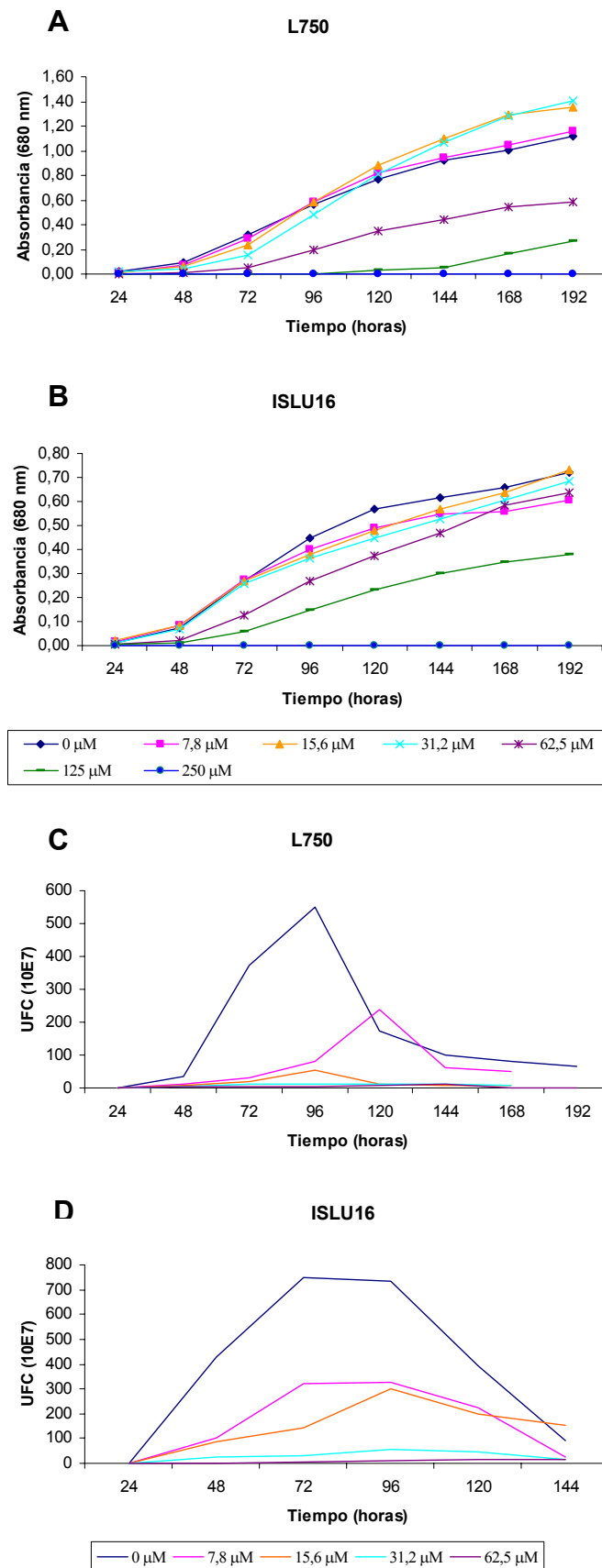


Figura 13: Efecto de concentraciones crecientes de glifosato sobre el crecimiento en vida libre de las cepas ISLU16 y L750 de *Bradyrhizobium* sp (Lupinus). A) Curva de crecimiento de L750. B) Curva de crecimiento de ISLU16. C) Tasa de crecimiento de L750: Unidades formadoras de colonias en 10  $\mu\text{l}$  de cultivo. D) Tasa de crecimiento de ISLU16. Los datos son la media de 3 medidas.

### 3. Cambios en el metabolismo carbonado del nódulo

En trabajos anteriores se ha demostrado que los efectos negativos provocados por herbicidas son debidos en su mayor parte a una disminución del aporte de fotosintetizados al nódulo (Sprout *et al.*, 1992). Además la alteración en la ruta de biosíntesis de aminoácidos causada por el glifosato, provoca una movilización de almidón y un desvío masivo de esqueletos carbonados a la ruta de ácido shikímico.

A la vista de estas consideraciones se abordó el estudio del efecto del herbicida sobre el metabolismo carbonado que nos permitió elucidar si de entre las posibles causas del drástico descenso de la actividad nitrogenasa esta la limitación en el aporte de carbono al bacterioide.

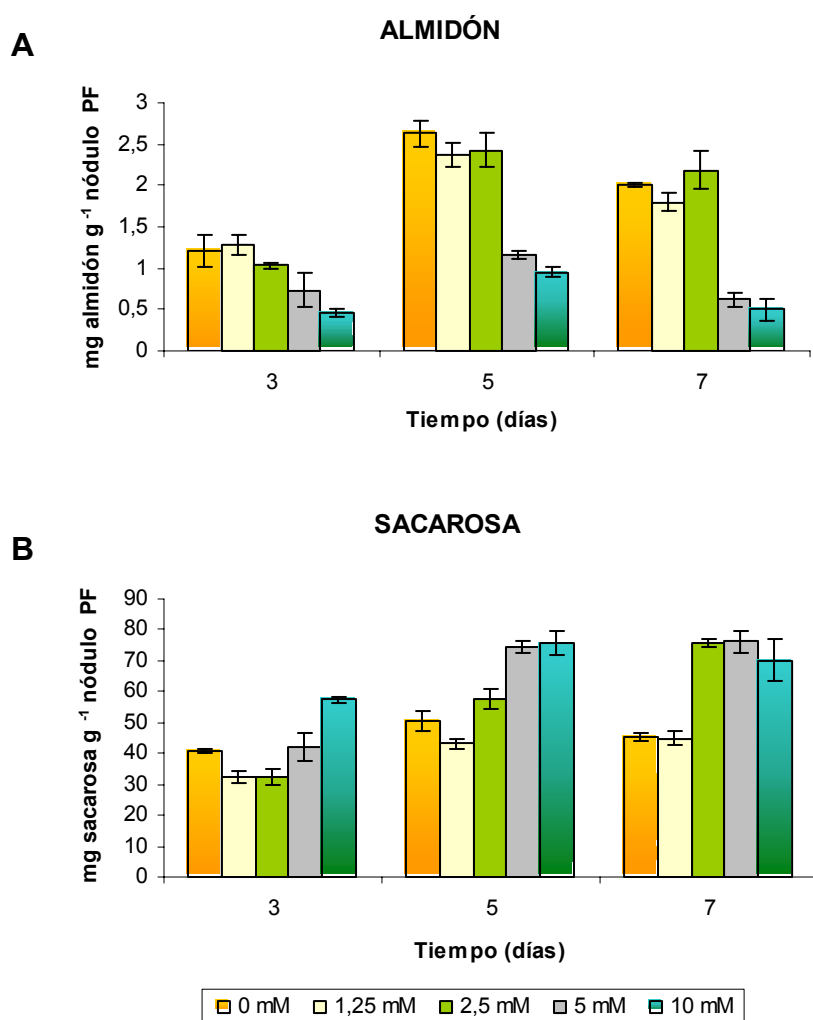


Figura 14: Efecto del glifosato sobre el contenido de almidón y sacarosa expresados en  $\text{mg g}^{-1}$  PF en nódulos de plantas de *Lupinus albus* inoculadas con la cepa ISLU16. A) Contenido de almidón. B) Contenido de sacarosa. Los valores son las medias de 3 muestras. Las barras indican el error estándar.

El estudio de los cambios en el contenido de almidón, como fuente de reserva, se abordó utilizando en primer lugar técnicas de determinación bioquímica, que posteriormente se contrastaron mediante microscopia óptica (apartado 5.1 de Resultados), como veremos más adelante.

El contenido de almidón y sacarosa en el citosol nodular, expresados en  $\text{mg g}^{-1}$  PF en plantas tratadas con glifosato, se representa en la figura 14. La acumulación de almidón mostró una tendencia ascendente a lo largo del tiempo, en ausencia de herbicida, hasta 5 días de tratamiento. En las plantas tratadas, la acumulación del contenido de almidón experimentó una caída a medida que la concentración del herbicida aumentaba.

El glifosato produce un descenso del contenido de almidón del 40% con una concentración de 5 mM y del 61% a 10 mM, siendo ambas caídas significativas. Este patrón descendente al aumentar la dosis del tratamiento, fue similar al aumento de la exposición en el tiempo al herbicida, manteniéndose la significación a partir de 5 mM, a pesar de que el porcentaje de inhibición aumentó un 69% en 5 mM y un 75% en 10 mM a los 7 días.

El contenido de sacarosa (fig. 14B), presentó una clara tendencia a incrementar a lo largo del tiempo en presencia de glifosato. A los 3 días aumentó en un 29% con la mayor concentración de herbicida aplicado. A los 5 y 7 días el incremento fue significativo a partir de 2,5 mM en un 12% y 40% respectivamente.

Por otra parte, se ha visto que la sacarosa sintasa (E.C.2.4.1.13), controla el flujo de carbono y energía del bacteroide, siendo particularmente sensible al estrés (González *et al.*, 1995), además de estar involucrada en la síntesis de almidón (Zrenner *et al.*, 1995).

Teniendo en cuenta estas consideraciones, se abordó el estudio sobre el efecto de la actividad sacarosa sintasa en nódulos sometidos a estrés con glifosato a diferentes tiempos.

Los datos que reflejan la actividad sacarosa sintasa indican que el factor tiempo es determinante en el efecto del herbicida. La caída de la actividad enzimática en el tiempo es significativa a partir de 5 días a la concentración de 10 mM (25%).

El comportamiento de la sacarosa sintasa, si bien a los 3 días no se vió afectado por el tratamiento, a los 7 días el efecto del glifosato provocó una inhibición de la enzima del 53% a una concentración de 5 mM y del 65% a 10 mM, y es estadísticamente significativo a partir de 1,25 mM con una bajada del 21% con respecto al control (fig. 15).

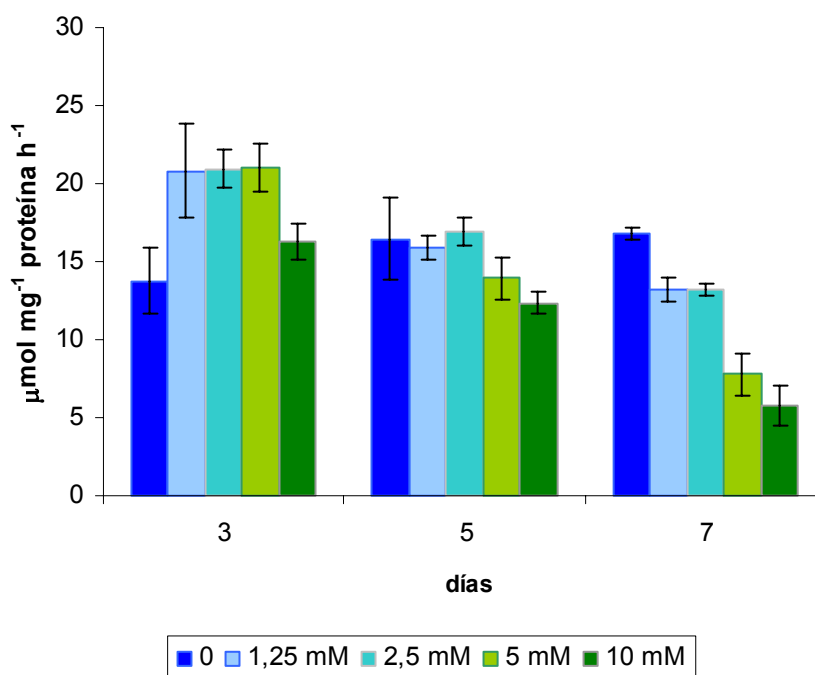


Figura 15: Actividad sacarosa sintasa (SS) en nódulos de plantas de *Lupinus albus* inoculadas con la cepa ISLU16 y tratadas con cuatro concentraciones de glifosato aplicado a las 5 semanas después de la siembra. Los datos son la media de 3 valores. Las barras indican el error estándar.

#### 4. Actividades enzimáticas del nódulo PEPc, MDH y AST

El estudio del efecto del glifosato sobre la actividad enzimática de fosfoenolpiruvato carboxilasa (EC 4.1.1.31, PEPc), malato deshidrogenasa (EC 1.1.1.37, MDH) y aspartato aminotransferasa (EC 2.6.1.1, AST), del metabolismo del carbono, se determinó en el citosol de nódulos como se describe en el apartado 2.7. de Materiales y Métodos.

El comportamiento de las actividades enzimáticas del citosol nodular bajo condiciones de ausencia y presencia de glifosato se muestra en la figura 16, en las que se manifiestan diferentes resultados dependiendo del tiempo de exposición.

En respuesta al tratamiento con glifosato, la actividad enzimática del citosol (MDH, PEPc y AST) se redujo significativamente a partir de concentraciones de 2,5 mM, en exposiciones largas de tiempo al herbicida. En este experimento los valores de actividad MDH fueron entre 10 a 12 veces superiores a los de la actividad PEPc y entre 5 a 7 veces a los de la actividad AST (fig. 16).

La actividad fosfoenolpiruvato carboxilasa muestra mayor sensibilidad al estrés con glifosato, ya que su actividad disminuye en un 80% con respecto al control, con la máxima dosis 10 mM, durante 7 días de exposición (fig. 16A).

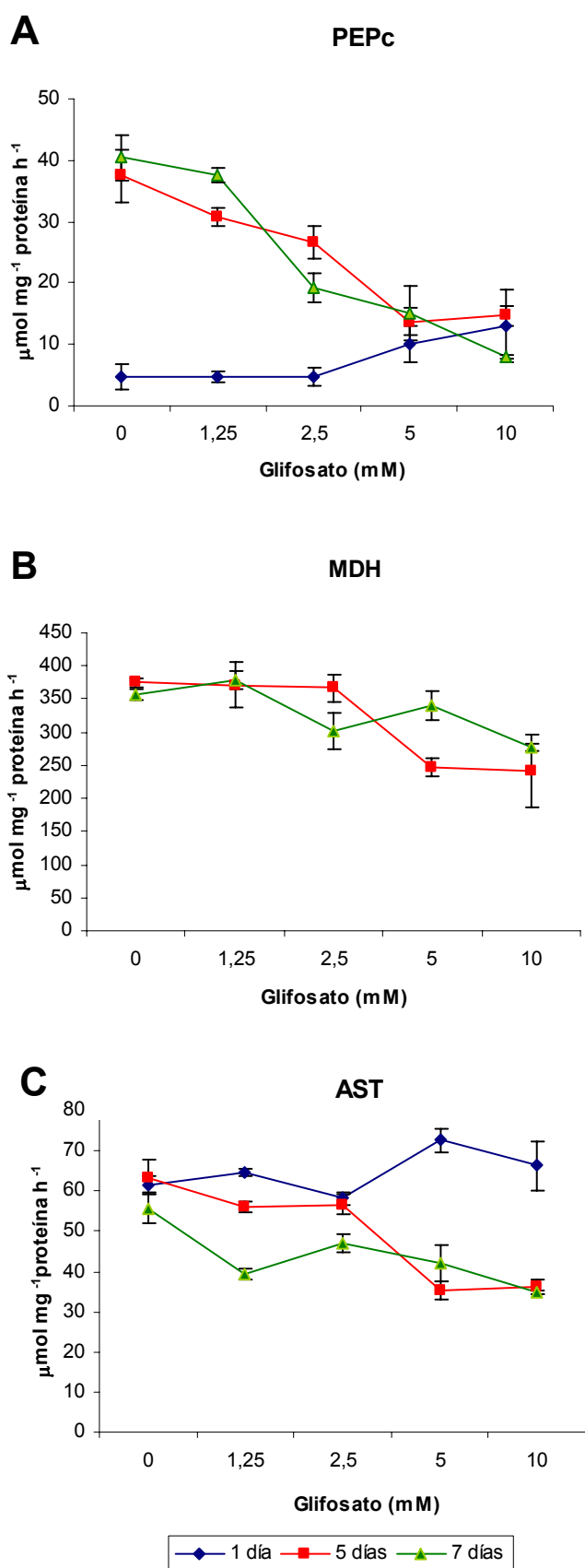


Figura 16: Actividades enzimáticas en el citosol nodular de plantas de *Lupinus albus* tratadas con glifosato. A) Fosfoenolpiruvato carboxilasa. B) Malato deshidrogenasa. C) Aspartato aminotransferasa. Los datos son la media de 3 medidas. Las barras indican el error estándar.

Mientras que las actividades MDH y AST en tratamientos de 5 días, se reducen en un 35% y 44% respectivamente, con respecto al control (fig. 16B y C), sin embargo, el glifosato no provoca la misma respuesta frente a la actividad enzimática, a tiempos cortos de exposición (1 día).

El glifosato, a las 24 horas de su aplicación, causó un ligero incremento del 18% en la actividad aspartato aminotransferasa, así como un aumento del 60% en los valores de la actividad fosfoenolpiruvato carboxilasa, si bien en los resultados anteriores a tiempos de exposición mayores, la alteración del metabolismo celular global condujo a la disminución de las actividades enzimáticas.

## **5. Estudio de las alteraciones estructurales por glifosato en nódulos y hojas de *Lupinus albus***

### **5.1. Efecto sobre la estructura nodular**

El estudio comparativo de la estructura nodular en las diferentes concentraciones de glifosato se ha observado mediante tinciones con PAS (Ácido periódico-base de Schiff) y con Toluidina.

En la microfotografía del nódulo de *Lupinus albus* se observan dos regiones claramente diferenciadas: la corteza nodular en la que se distinguen tres zonas y la región central infectada (fig. 17A; de Lorenzo, 1992). La corteza externa (zona 1) esta constituida por varias capas celulares; debajo se encuentra la corteza media ó parénquima nodular (zona 2) que consta de dos o tres capas de células de mayor tamaño con paredes celulares engrosadas alrededor de los espacios intercelulares. Los espacios intercelulares de las zonas 1 y 2 son grandes. A continuación se encuentra la corteza interna o zona 3 que consta de dos capas de células de menor tamaño, muy empaquetadas y con espacios intercelulares pequeños. La zona 2 y la zona 3 forman la barrera de resistencia a la difusión de oxígeno (de Lorenzo, 1992). Finalmente, en la región central está la zona infectada, constituida exclusivamente por células infectadas repletas de simbiosomas (fig. 17B).

La aplicación de glifosato produce alteraciones en los componentes del nódulo. Con la tinción de PAS (fig. 18) se observa disminución del contenido de almidón tanto en la corteza como en la zona infectada. En el nódulo control se muestra la localización de los amiloplastos distribuidos alrededor de los espacios intercelulares y de las paredes celulares de las células infectadas. Cabe destacar la disposición periférica del almidón en la capa de células infectadas en contacto con la corteza (interfase zona infectada-corteza, fig. 18A). En la corteza se encuentran agrupaciones amiloplásticas distribuidas por el citoplasma celular. No existen grandes diferencias en la cantidad de almidón incluso a la máxima concentración de glifosato, con un día de aplicación. A mayor tiempo de



exposición del herbicida (5 días) y al aumentar la concentración, los gránulos de almidón van disminuyendo progresivamente, siendo a partir de 2,5 mM mayor la disminución hasta que con 5 mM, los amiloplastos son apenas visibles en la zona infectada y se distribuyen desorganizadamente tanto por la zona infectada como en las células de la interfase corteza-zona infectada (fig. 18B, C y D). Estos datos están en correlación con el descenso en la acumulación del contenido de almidón determinado bioquímicamente (fig. 14A).

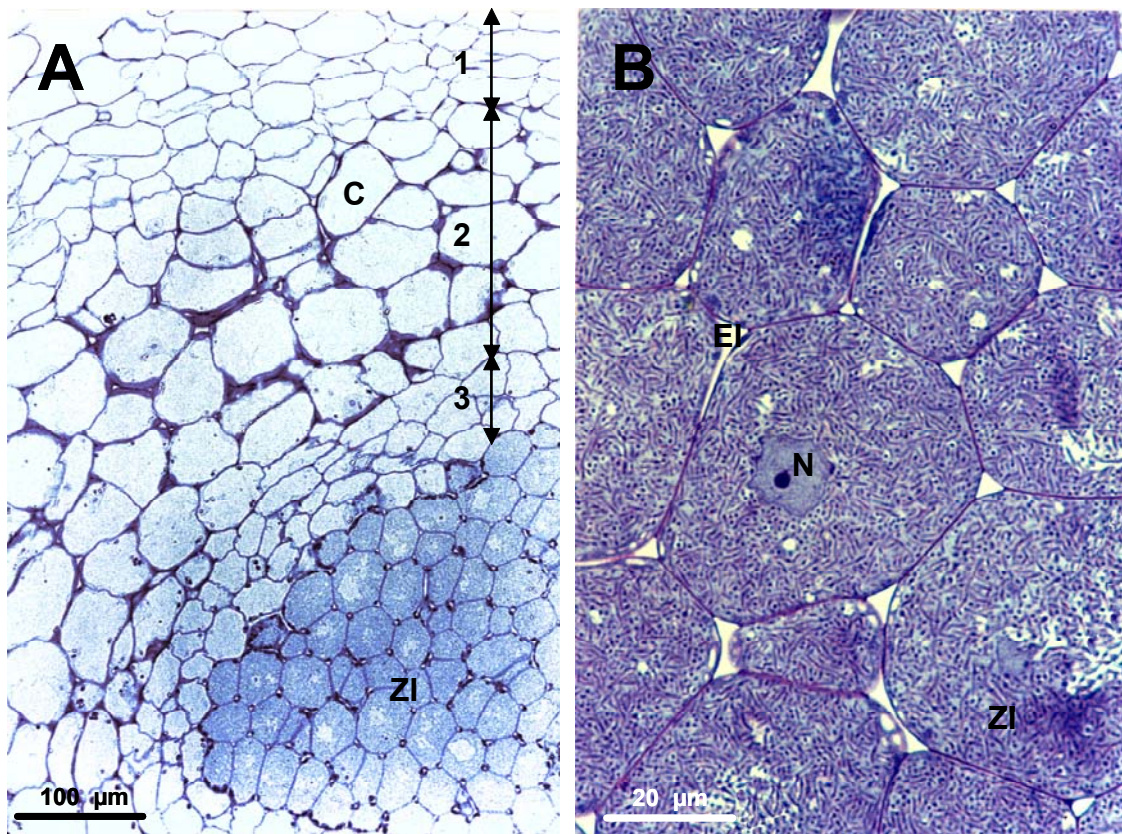


Figura 17: A) Microfotografías ópticas de la sección transversal de nódulo de *Lupinus albus* cv. *Multolupa* inoculada con la cepa ISLU16. B) Detalle de las células infectadas en cuyo interior se encuentran los bacteroides. C: corteza; ZI: zona infectada; N: núcleo; EI: espacio intercelular; 1: corteza externa; 2: corteza media (parénquima nodular); 3: corteza interna.

En relación al contenido de la glicoproteína, ésta disminuye conforme aumenta la concentración del herbicida, llegando a tener los espacios intercelulares más abiertos a altas concentraciones de glifosato (fig. 18), lo que corrobora el descenso cuantitativo observado en el análisis *Western blot* que presentan los anticuerpos MAC 236 y 265 (fig. 35 y 36).

En la zona 3 de la corteza se observa un mayor grado de compactación, quedando las células perfectamente encajadas (fig. 18D). Después de 5 días de tratamiento, al observar la zona infectada teñida con toluidina, se diferencian claramente células infectadas sin aparentes alteraciones estructurales, junto con células infectadas

## *Resultados*

que experimentan un progresivo aumento de la vacuolización con respecto al control (fig. 19A). Este inicial grado de vacuolización (fig. 19B) junto con la destrucción gradual de las células infectadas y de su contenido celular bacteroidal (fig. 19C) conllevan a una alteración global de la zona infectada nodular cuando están expuestos a la mayor concentración 10 mM de glifosato (fig. 19D).



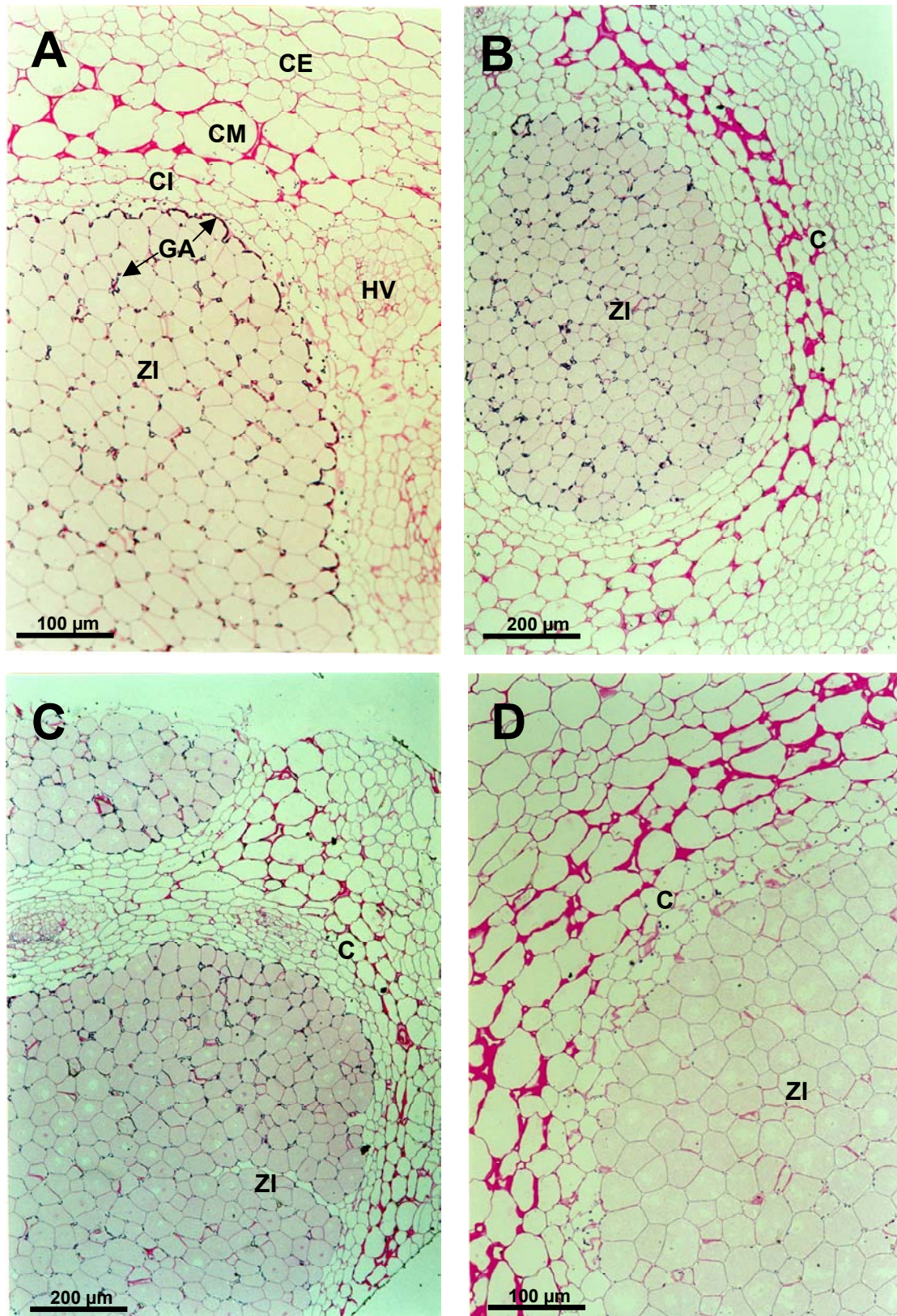


Figura 18: Microfotografías ópticas de secciones de nódulos de *Lupinus albus* inoculadas con la cepa ISLU16, después de 5 días de tratamiento con glifosato. A) Control. Se observan las dos regiones diferenciadas: corteza y zona infectada, en cuyo interior se localizan los amiloplastos. En los tratamientos se visualiza una disminución progresiva de los amiloplastos. B) 1,25 mM. C) 2,5 mM y D) 5 mM. C: corteza; CE: corteza externa; CM: corteza media; CI: corteza interna; GA: gránulos almidón; HV: haz vascular; ZI: zona infectada.



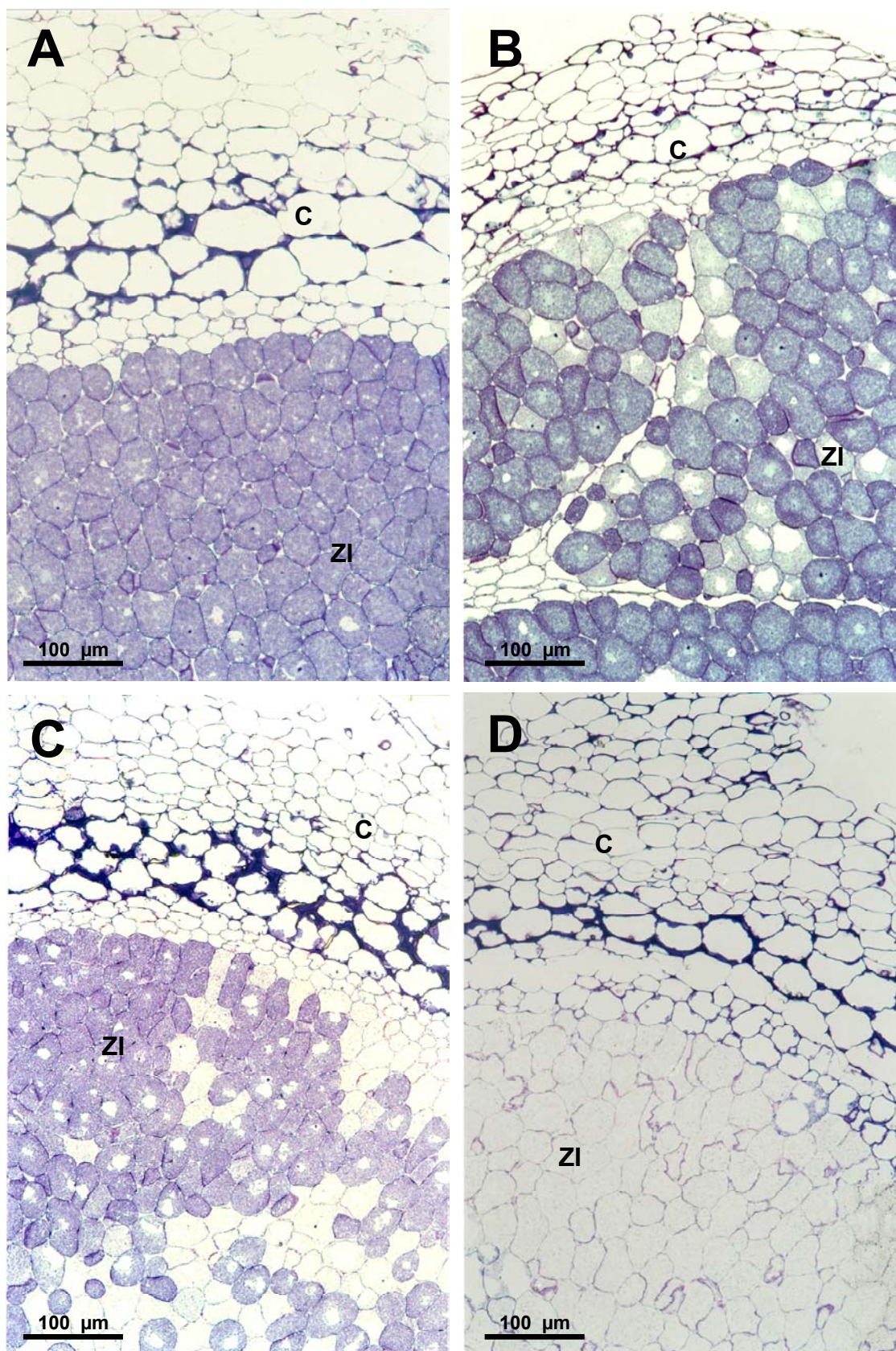


Figura 19: Microfotografías ópticas de secciones de nódulos de *Lupinus albus* inoculadas con la cepa ISLU16, después de 5 días de tratamiento con glifosato. A) Control. B) 2,5 mM. C) 5 mM y D) 10 mM. C: corteza; ZI: zona infectada.



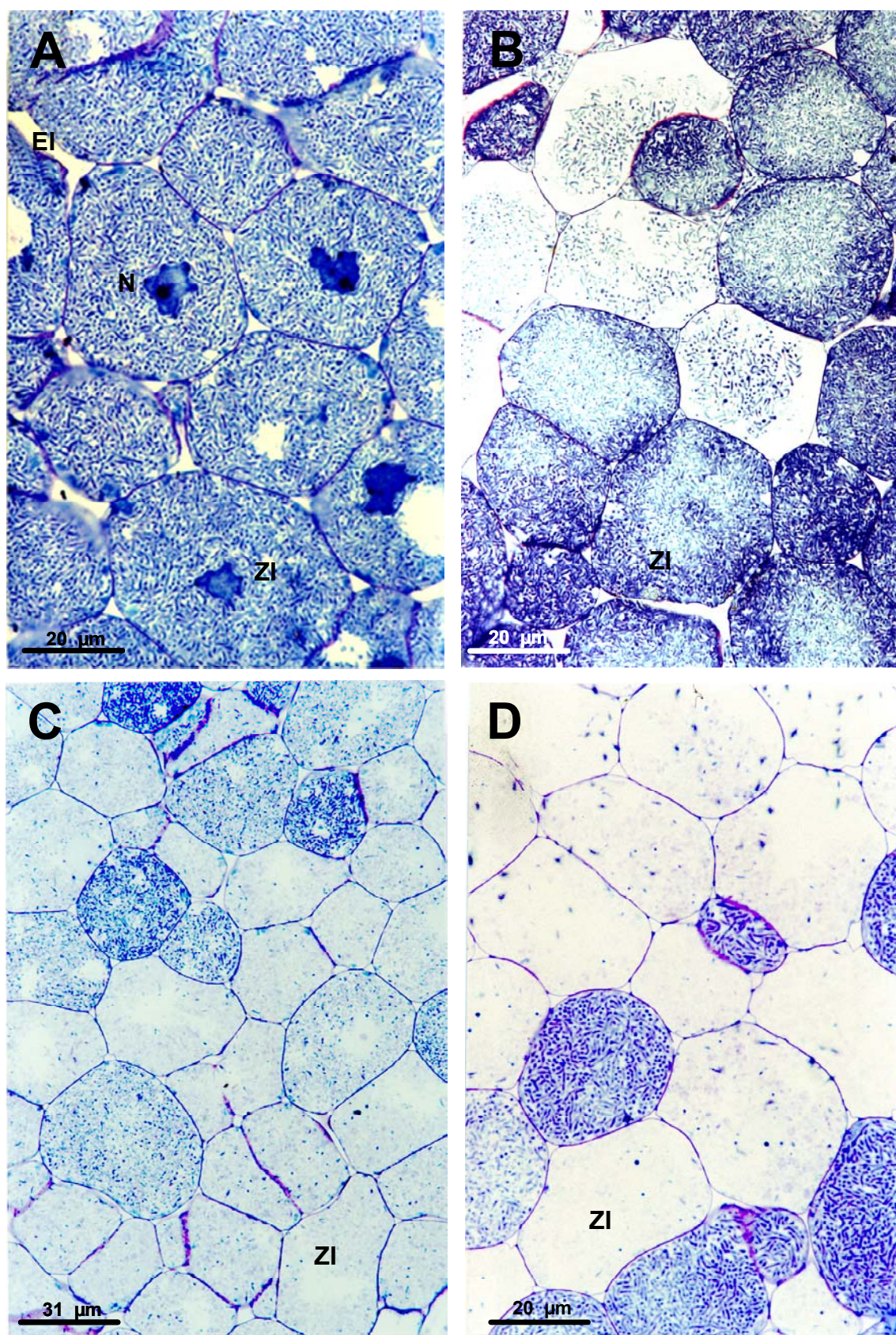


Figura 20: Microfotografías ópticas de la zona infectada nodular de *Lupinus albus* después de la exposición al glifosato durante 5 días. A) Control. Observación con el tratamiento de la progresiva destrucción de los simbiosomas y posteriormente de las células infectadas. B) 2,5 mM. C) 5 mM y D) 10 mM. EI: espacio intercelular; N: núcleo; ZI: zona infectada.

En la microfotografía 20A se observa en detalle el aspecto de varias células infectadas, repletas de simbiosomas en un nódulo control. Con el tratamiento, algunos simbiosomas comienzan a mostrar síntomas de senescencia (fig. 20B). Asimismo, conforme aumenta la concentración de herbicida, aumenta el número de células infectadas alteradas estructuralmente (fig. 20C), presentando finalmente destruido su contenido celular (fig. 20D), pero manteniendo la pared celular.

### 5.2. Efectos del glifosato en la ultraestructura del aparato fotosintético

El estudio ultraestructural de las células del mesófilo de la hoja de *Lupinus albus* mediante microscopía electrónica de transmisión (MET), se muestra en las figuras 21, 22 y 23.

Los cambios ultraestructurales producidos en las plantas tratadas con respecto al control, dependen de la concentración del herbicida y del tiempo de aplicación. En las células de mesófilo sin tratar (fig. 21A), se observan los cloroplastos situados junto a la pared celular, alrededor de una gran vacuola, presentando una estructura tilacoidal bien organizada, con grana en apilamiento perfecto y lamelas estromáticas, manteniendo el alineamiento paralelo con el eje principal del cloroplasto. Asimismo, se observa la presencia de grandes gránulos de almidón y abundancia de ribosomas.

Después de 5 días del tratamiento, desde la concentración de herbicida más baja 1,25 mM (fig. 21B, C y D), a la más alta aplicada 10 mM (fig. 23), las células del mesófilo presentan dos tipos de cloroplastos bien diferenciados, en unos observamos la estructura tilacoidal bien organizada y sin signos aparentes de degradación. Sin embargo, el segundo tipo de cloroplasto presenta la estructura tilacoidal y el orgánulo en general alterado. Este efecto se produce gradualmente, haciéndose más evidente a altas dosis, si bien se mostraban signos de senescencia precoz desde concentraciones intermedias.

A una concentración de 1,25 mM, las variaciones en la estructura son escasas (fig. 21C), si bien se observa en algunos casos la estructura tilacoidal afectada. Se produce el deterioro de los grana, lo cual afecta a los tilacoides que no pueden ser claramente identificados. Los grana aparecen densos a los electrones, como una masa compacta, aunque sin perder la alineación paralela (fig. 21D). A partir de 2,5 mM comienzan a observarse alteraciones en la ultraestructura paralela del grana e intergrana, con pérdida del alineamiento paralelo con el eje principal del cloroplasto con un incremento en el número de grana y disminución de los intergrana. Es característico de los cloroplastos alterados, la existencia del estroma muy denso a los electrones (fig. 21E) y generalmente alteraciones en el tonoplasto y en la membrana cloroplástica (fig. 21F).

En las figuras 21E, F y 22 se observa un aumento progresivo de las alteraciones estructurales. En la concentración 5 mM junto a cloroplastos poco afectados se aprecia cloroplastos con los apilamiento de los granas desintegrados, que han perdido la orientación paralela al eje del cloroplasto (fig. 22A). Estos grana adoptan formas sinuosas, con una distribución en orientación curva (fig. 22B), además se presentan signos indicativos de la pérdida de lípidos de membrana y la presencia de glóbulos lipídicos (fig. 22D y F), característicos de tejidos degradados.

A esta concentración también se observan cloroplastos con un mayor número de tilacoides por grana. El incremento se produce tanto en número como en tamaño con pocas uniones intergranales (fig. 22E). El estroma se muestra con una elevada densidad a los electrones (fig. 22A, C y E).

La alteración de otros orgánulos, como la mitocondria (fig. 22C), si bien es un efecto progresivo, fue también evidente a partir de 1,25 mM (fig. 21B y C). A altas concentraciones se observa discontinuidad de la membrana mitocondrial y deformación de las crestas (fig. 22F). Sin embargo, otros orgánulos como el aparato de Golgi permanece inalterado (fig. 22C).

En las células del mesófilo tratadas con una concentración de 10 mM, la estructura del aparato fotosintético está muy afectada en su mayoría (fig. 23). La presencia de vesículas es más frecuente en este tratamiento que en los anteriores. Normalmente el sistema lamelar se presenta desintegrado o con escasas lamelas de apariencia laxa (fig. 23 B y D). En la figura 22B se observa la ruptura de la membrana cloroplastídica. Además los tilacoides aparecían también con distintas orientaciones con acumulaciones lamelares de forma arqueada, llegando a producir ruptura de granas (fig. 23D). En algunas células del mesófilo se aprecian cloroplastos con granulos de almidón (fig. 23B y C), observándose también la presencia de plastoglóbulos (fig. 23C).



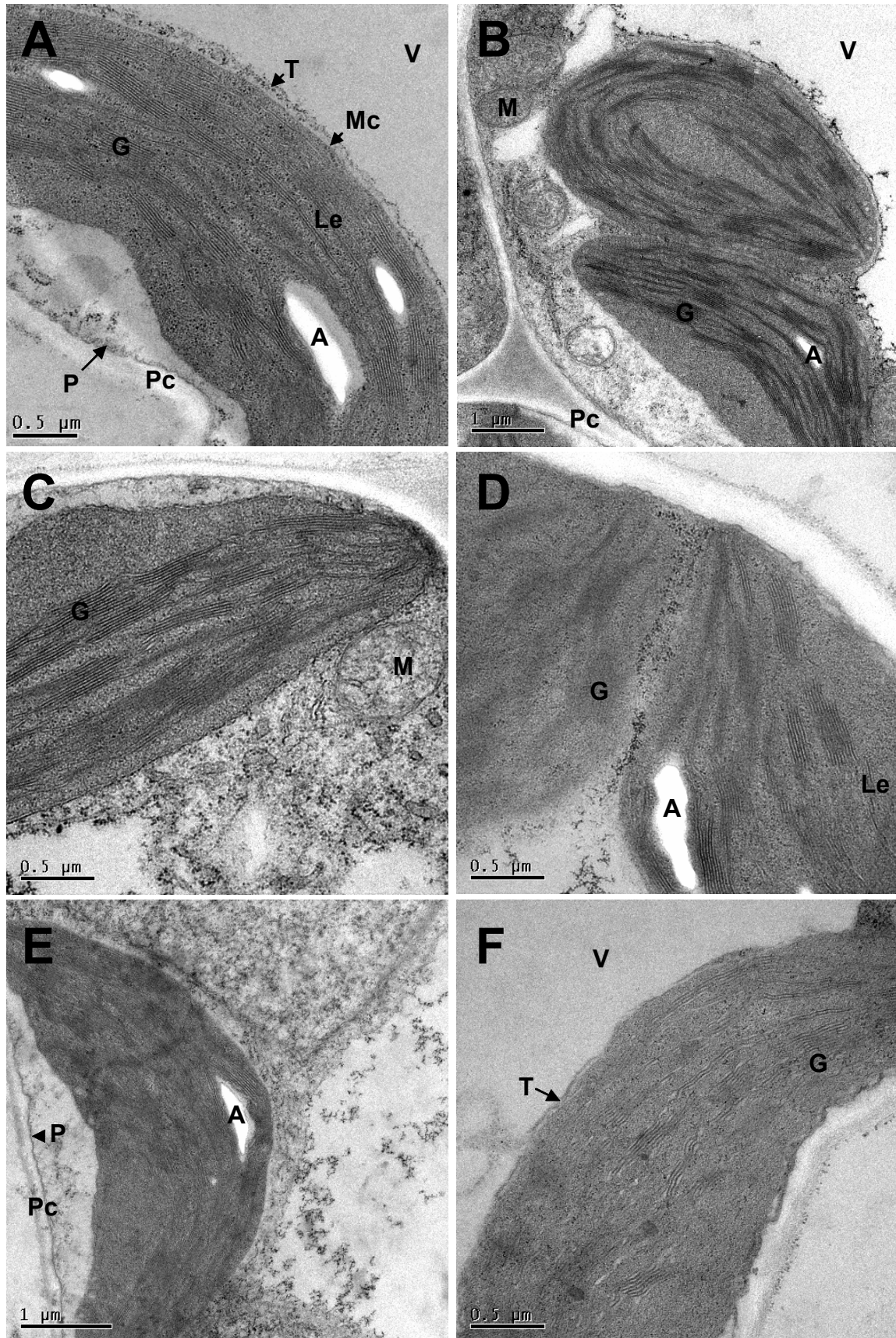


Figura 21: Microfotografías electrónicas de transmisión de secciones de cloroplastos de *Lupinus albus* inoculadas con la cepa ISLU16, 5 días después de la aplicación del glifosato. A) Control. B), C) y D) 1,25 mM. E) y F) 2,5 mM. A: almidón; Le: lamela estromática; G: grana; Mc: membrana cloroplástica; M: mitocondria; P: plasmalema; Pc: pared celular; T: tonoplasto; V: vacuola.



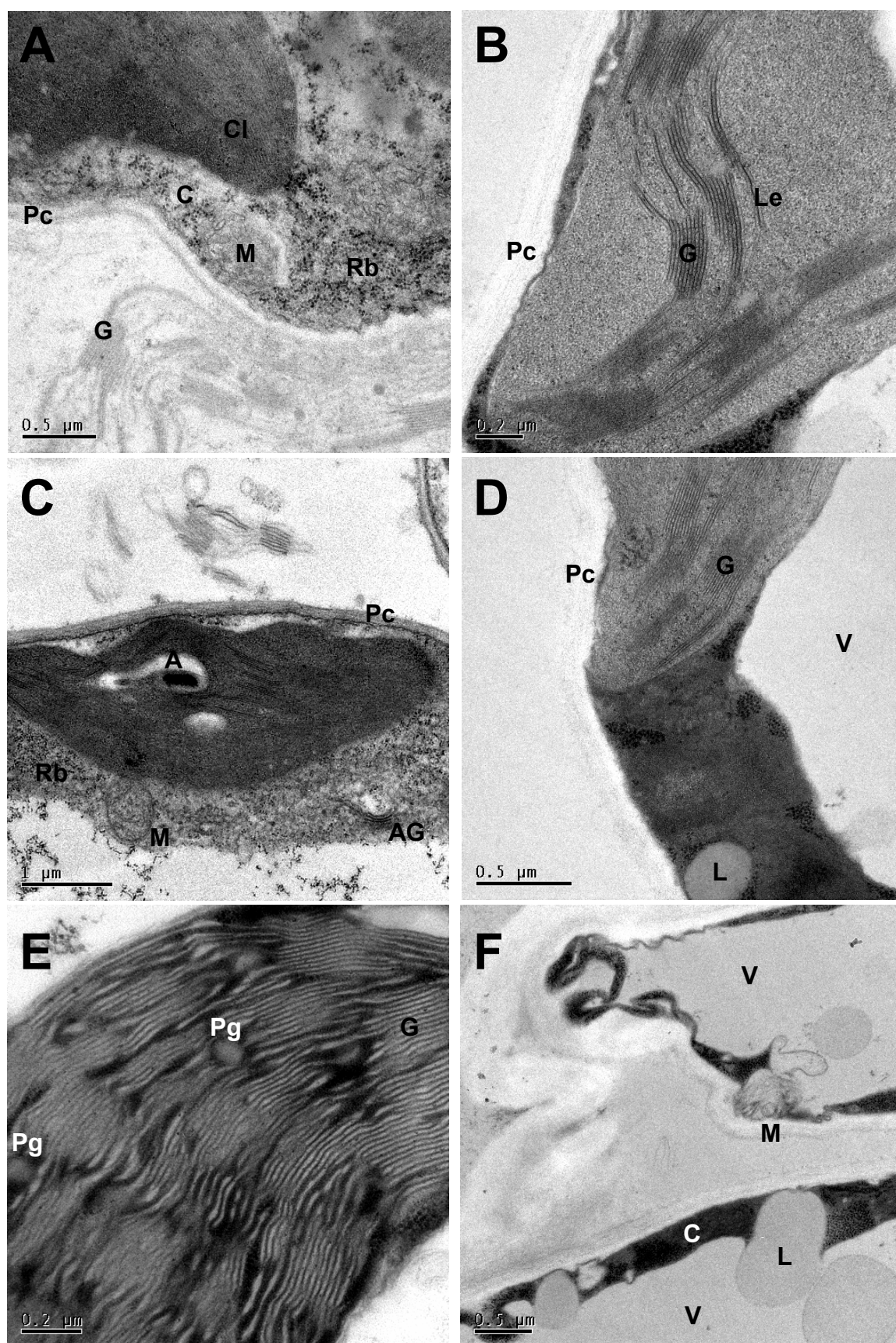


Figura 22: (A-F) Microfotografías electrónicas de transmisión de secciones de cloroplastos de *Lupinus albus*, inoculados con la cepa ISLU16 y tratados con glifosato (5 mM), 5 días después de la exposición. A: almidón. AG: aparato de Golgi. C: citoplasma; Cl: cloroplasto; L: lípidos; Le: lamela estromática; G: grana; M: mitocondria; P: plasmalema; Pc: pared celular; Pg: plastoglobulo; Rb: ribosomas; T: tonoplasto; V: vacuola.

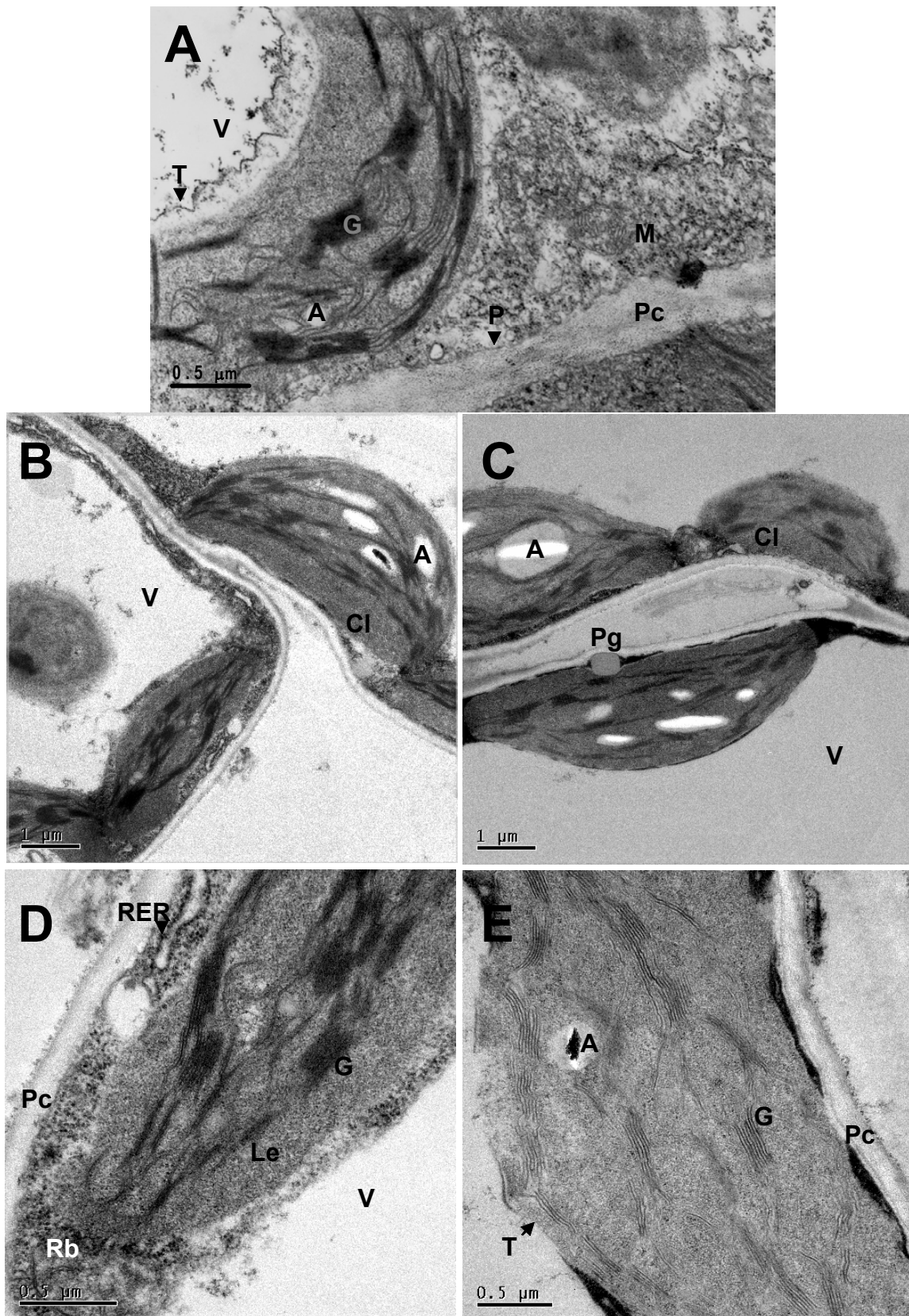


Figura 23: (A-F) Microfotografías electrónicas de transmisión de secciones de cloroplastos de *Lupinus albus*, inoculados con la cepa ISLU16, después de 5 días de la aplicación de glifosato (10 mM). A: almidón; Cl: cloroplasto; L: lípidos; Le: lamela estromática; G: grana; M: mitocondria; P: plasmalema; Pc: pared celular; Pg: plastoglobulo; Rb: ribosomas; RER: retículo endoplasmático rugoso; T: tonoplasto; V: vacuola.

### 5.3. Efectos del glifosato en la ultraestructura del nódulo

El estudio ultraestructural en el nódulo, se realizó a partir de muestras de 5 días después del tratamiento. En la zona de la corteza no se observaron cambios significativos, mientras que en la zona infectada las alteraciones observadas mostraban claros signos de senescencia precoz con respecto al control (fig. 24). En los nódulos control las células infectadas aparecen repletas de simbiosomas con un bacteroide por simbiosoma (fig. 24A).

Los cambios en la ultraestructura, como muestran las microfotografías, suceden gradualmente, provocando un efecto degenerativo progresivo conforme aumentaba el tratamiento. Con 1,25 mM la única alteración observada fue el oscurecimiento del citosol nodular (fig. 24B). A partir de 2,5 mM en la zona infectada aparecen células de estructura conservada (fig. 25C), entremezcladas con células conteniendo bacteroides parcial o totalmente lisados, con contenido citoplásmico denso a los electrones (fig. 24C-F y 26A y C).

Al mismo tiempo, es posible observar modificaciones en la estructura bacteroidal. Las membranas peribacteroidales han sufrido modificaciones. En algunos casos aparecen rotas o han desaparecido dejando a los bacteroides en contacto directo con el citoplasma nodular (fig. 24C). En otros casos estas membranas sufren deformaciones en forma de sinusoide (fig. 24D, flechas). La degradación del bacteroide puede también empezar por el citoplasma bacteroidal quedando sólo la membrana bacteroidal y peribacteriodal dando lugar a los denominados “ghost” (fig. 24E-F).

El citosol vegetal se ha llenado de vacuolas, indicando una degeneración o destrucción de los bacteroides, produciéndose un citoplasma bacteroidal que se muestra con una elevada densidad electrónica, tras la desintegración celular sufrida en tratamientos de 5 mM y 10 mM de glifosato (fig. 24E-F). El núcleo presenta una menor afectación con la aplicación de 10 mM durante 5 días (fig. 24F).

Asimismo a 10 mM ocasionalmente en las células infectadas los bacteroides parecen mantener su estructura intacta, sin embargo se observa una diferencia con los bacteroides controles, que radica en la aparente desaparición de la membrana peribacteroidal (fig. 26E-F).

Este estudio ultraestructural se ha completado con la observación directa de las estructuras internas, mediante microscopía electrónica de barrido a baja temperatura, fractura por congelación, que ha demostrado una disminución en el tamaño de las células infectadas, tras 7 días de tratamiento con la mayor dosis 10 mM, con respecto a células infectadas sin tratar (fig. 27B y D). Pero no sólo se ha reducido el tamaño de las células en la zona de infección, sino que la forma, muy próxima a un dodecaedro rómbico, se alteró perdiendo su estructura (fig. 27A y C). Se ha visualizado, además, una

desorganización global del interior de la célula infectada y ruptura del entramado bacteroidal, lo que genera un daño a nivel de toda la estructura global.

#### 5.4. Inmunolocalización de leghemoglobina

La localización inmunocitoquímica de leghemoglobina, mediante microscopía electrónica, se presenta mayoritariamente en el citosol de las células infectadas del nódulo de lupino (fig. 25A y B) como había sido descrito por Vivo *et al.*, 1989. El inmunomarcaje es específico al no encontrarse localizado en orgánulos subcelulares y bacteroides (fig. 25B).

Con 5 días de tratamiento de glifosato 2,5 mM, se observa una disminución del número de partículas de oro lo que indica un descenso en el contenido de leghemoglobina (fig. 25C y D); si bien en la mayor aplicación 10 mM las células con signos senescentes de la zona infectada mostraban el citosol bacteroidal desintegrado (fig. 26A y B), sin embargo en el citoplasma de la célula vegetal, el inmunomarcaje se mantuvo (fig. 26C y D).

La cuantificación del número de partículas de oro, como muestra la tabla 1, nos refleja diferencias entre células infectadas tratadas con glifosato que presentan los bacteroides con una morfología intacta y células infectadas alteradas estructuralmente en el citosol nodular y en los bacteroides (fig. 26A). La bajada en el número de partículas es significativa a partir de 2,5 mM.

Tratamiento Glifosato (mM)	Partículas de oro (1 $\mu\text{m}^2$ )
0 (Control)	360 $\pm$ 9,27 a
2,5 células infectadas con bacteroides intactos	158,3 $\pm$ 8,69 b
2,5 células infectadas con bacteroides degenerados	64 $\pm$ 10,06 c
10 células infectadas con bacteroides intactos	95 $\pm$ 5,26 c
10 células infectadas con bacteroides degenerados	56,3 $\pm$ 7,56 c

Tabla 1: Cuantificación del inmunomarcaje con anti-leghemoglobina en la zona infectada de nódulos de lupinos. Los valores son la media de 10 micrografías  $\pm$  SE, n=3. La letra que sigue a la media indica las diferencias significativas por LSD ( $P \leq 0,05$ ).



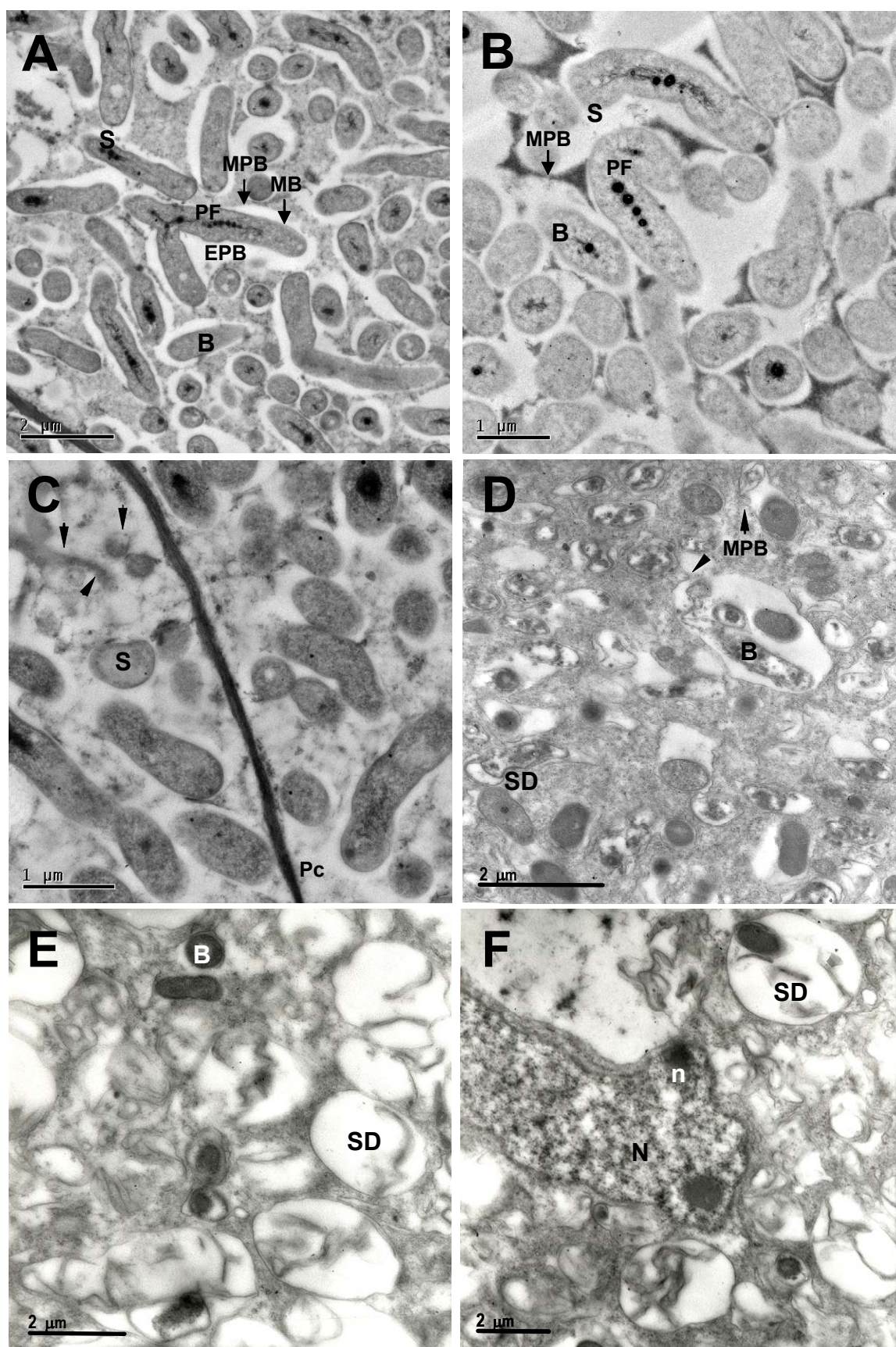


Figura 24: Microfotografías electrónicas de transmisión de secciones transversales nodulares de *Lupinus albus* después de 5 días de exposición al glifosato. A) Control B) 1,25 mM C) 2,5 mM D) 5 mM E) 10 mM F) 10 mM. B: bacteroides; C: citosol; EPB: espacio peribacteroidal; MB: membrana bacteroidal; MPB: membrana peribacteroidal; N: Núcleo; n: nucleolo; Pc: pared celular; PF: polifosfato; S: simbiosoma; SD: simbiosoma degenerado.

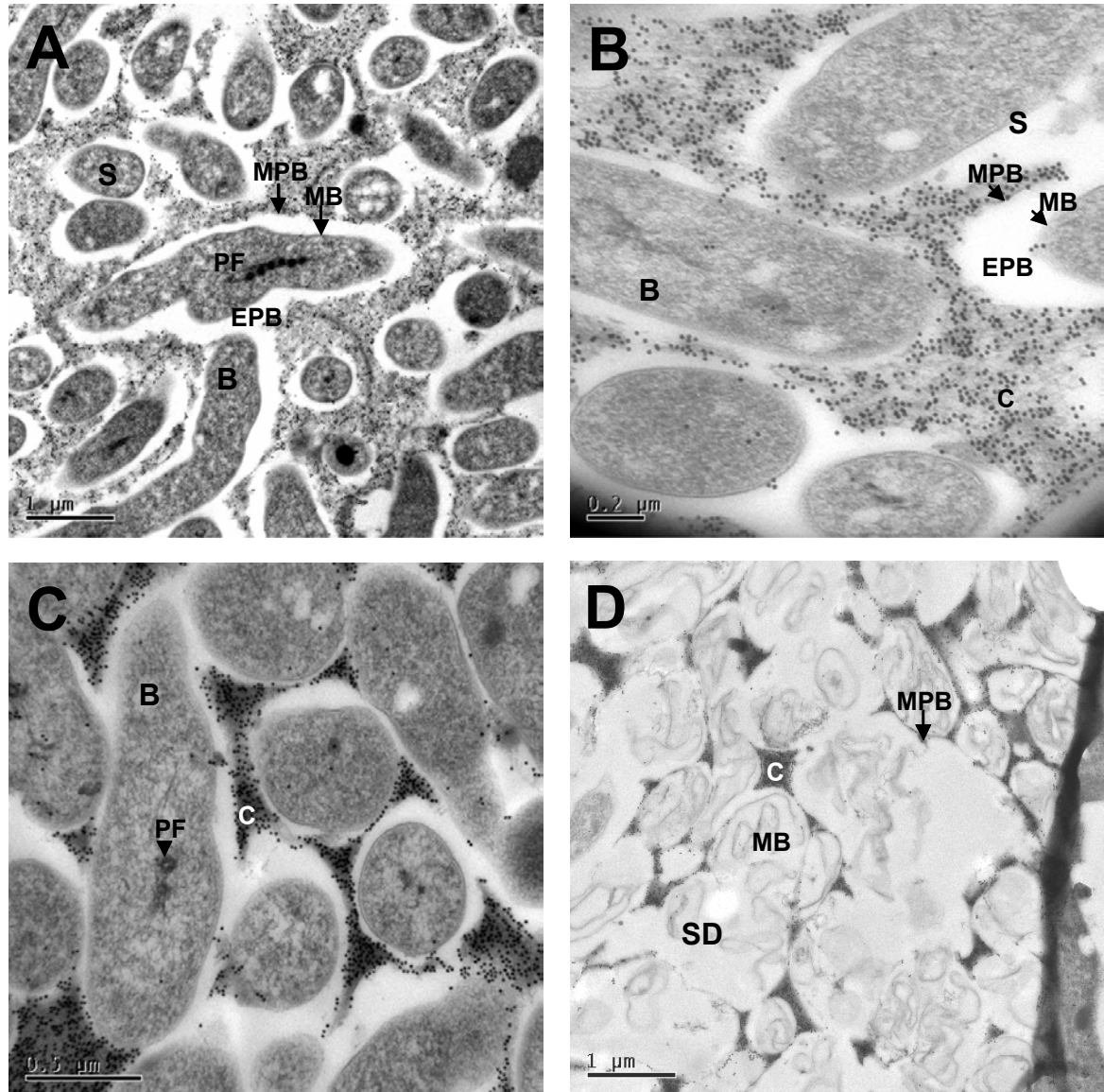


Figura 25: Microfotografías electrónicas de transmisión de secciones transversales nodulares de *Lupinus albus*. A) y B) Inmunolocalización de la leghemoglobina en el citosol de las células infectadas control. C) y D) Inmunomarcage en las células infectadas tratadas con 2,5 mM de glifosato, después de 5 días de exposición. B: bacteroides; C: citosol; EPB: espacio peribacteroidal; MB: membrana bacteroidal; MPB: membrana peribacteroidal; PF: polifosfato; S: simbiosoma; SD: simbiosoma degenerado.



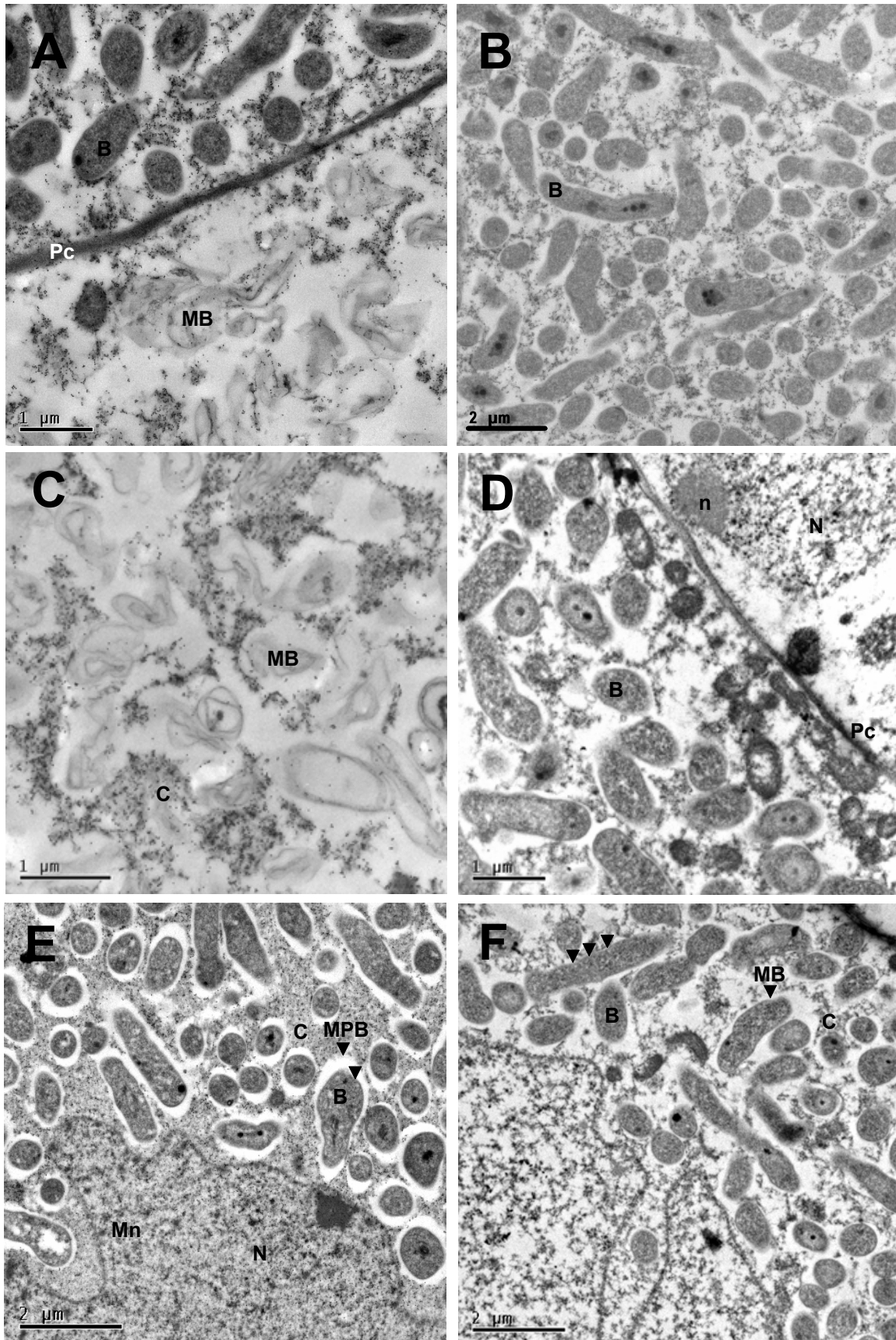


Figura 26: Microfotografías electrónicas de transmisión de secciones transversales nodulares de *Lupinus albus*. (A-D) Inmunolocalización de leghemoglobina en la zona infectada de nódulos tratados con glifosato (10 mM) después de 5 días. E) Inmunolocalización de la leghemoglobina en el citosol de las células infectadas control. F) Inmunomarcage en las células infectadas tratadas con 10 mM de glifosato, observándose la pérdida de la membrana peribacteroidal (flechas). B: bacteroides; C: citosol; EPB: espacio peribacteroidal; MB: membrana bacteroidal; Mn: membrana nuclear; MPB: membrana peribacteroidal; N: núcleo; n: nucleolo; Pc: pared celular.

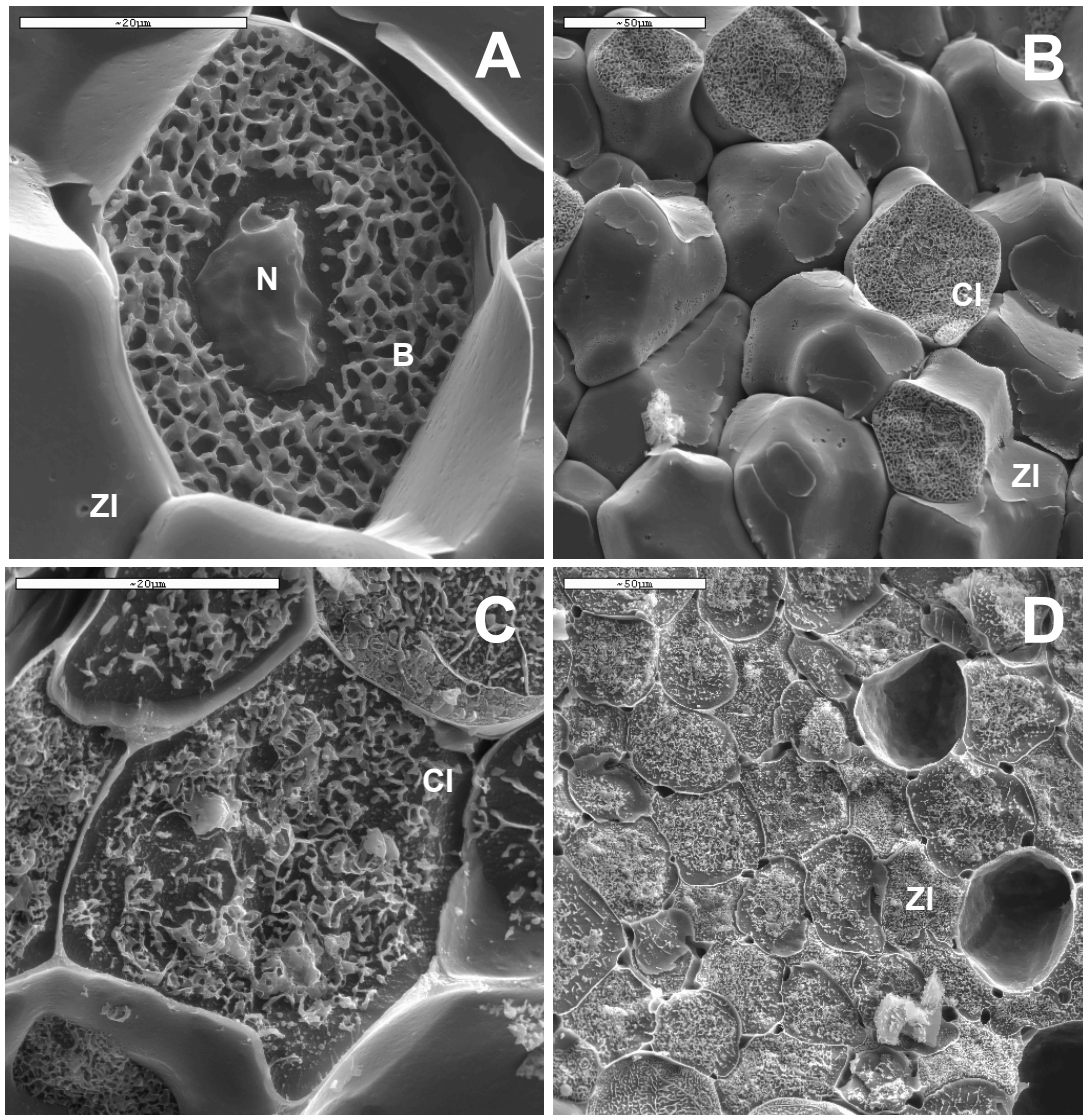


Figura 27: Fotografías de microscopía electrónica de barrido a baja temperatura de secciones nodulares de *Lupinus albus*, después de 7 días de tratamiento con glifosato. A) Detalle de una célula infectada control. B) Criofractura control de la zona infectada. C) Detalle de las alteraciones estructurales producidas por el glifosato (10 mM) en una célula infectada. D) Visualización de la desorganización general de la zona infectada. B: bacteroides; CI: célula infectada; N: núcleo; ZI: zona infectada.



## 6. Alteraciones en el metabolismo fenólico

Como consecuencia de la inhibición del enzima EPSPs por glifosato y la desregulación causada en la ruta de shikímico, algunos intermediarios como shikimato y ácidos hidroxibenzoicos mayoritariamente se acumulan en los tejidos de la planta. Este efecto fue diferente según la fuente de nitrógeno de la planta (nitrato o nitrógeno) a tiempos de exposición (1, 2 y 3 días).

Para el experimento de determinación de fenoles en tejidos vegetales, se tomaron muestras de hojas (maduras y jóvenes) y nódulos de plantas inoculadas con *Bradyrhizobium* sp. (*Lupinus*) cepa ISLU16 y plantas tratadas con nitrato.

Los resultados muestran que el efecto del glifosato sobre el metabolismo fenólico es muy rápido, ya que en todos los órganos se detecta acumulación de shikimato desde las primeras 24 horas (fig. 28, 29 y 30).

En hojas controles jóvenes y maduras no existe acumulación de ácido shikímico. Sin embargo, en hojas tratadas con glifosato el contenido de ácido shikímico fue proporcional a la dosis y duración del tratamiento, existiendo diferencias significativas a partir de 1,25 mM, tanto en hojas jóvenes como en hojas maduras (fig. 28A y B).

Las hojas jóvenes son las que presentan mayor acumulación de fenoles, a pesar de que las hojas maduras son las que reciben mayoritariamente el herbicida, esto refleja la rápida traslocación del glifosato hacia los sumideros metabólicos. Las plantas tratadas con nitrato muestran una acumulación continua de ácido shikímico mayor que las plantas inoculadas con la cepa ISLU16. Y no sólo la acumulación es menor con la inoculación sino que se relentiza o paraliza a partir del segundo día. Asimismo, la inoculación aportó un mayor contenido en proteínas y en clorofila total en hojas, frente al tratamiento con nitrato.

El contenido de protocatéquico, aunque fue del orden de 2 veces mayor que el shikímico, siguió el mismo patrón de acumulación continuo en el tiempo y menor en plantas inoculadas que sin inocular (fig. 29A), mostrando diferencias significativas a partir de 1,25 mM desde 1 día de exposición en hojas jóvenes (fig. 29B).

La acción del herbicida sobre otros ácidos hidroxibenzoicos determinados, ácido gálico, ácido gentísico, ácido 4-OH-hidroxibenzoico, ácido siríngico, y ácido vanílico, es poco significativa puesto que no existen diferencias en ninguno de los orgánulos, ni tratamientos a lo largo del tiempo analizado.

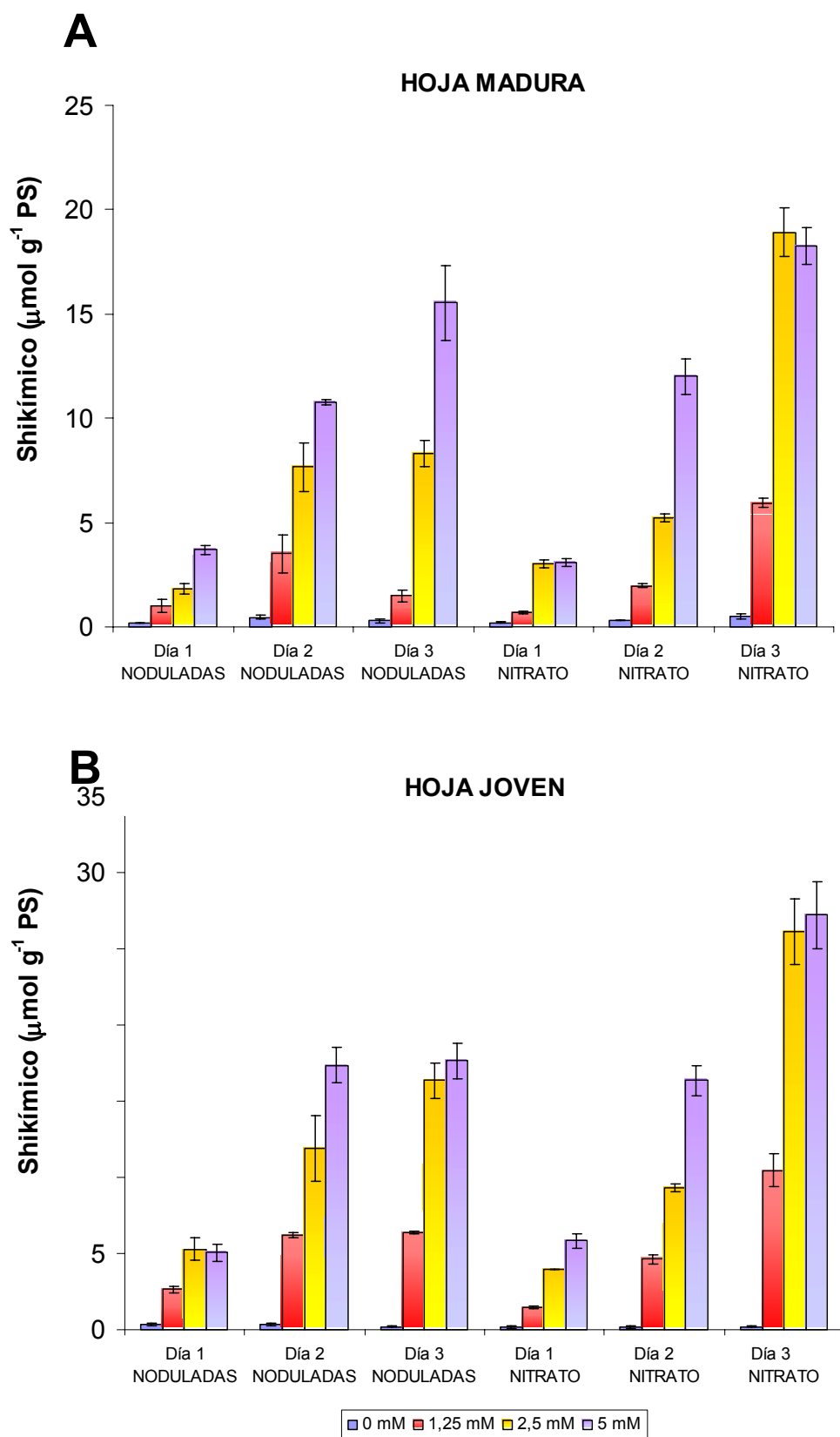


Figura 28: Contenido en ácido shikímico ( $\mu\text{mol g}^{-1}$  PS) en hojas de *Lupinus albus* tratadas con glifosato (1,25; 2,5 y 5 mM). A) Hoja madura. B) Hoja joven. Los valores son la media de tres medidas. Las barras indican el error estándar.

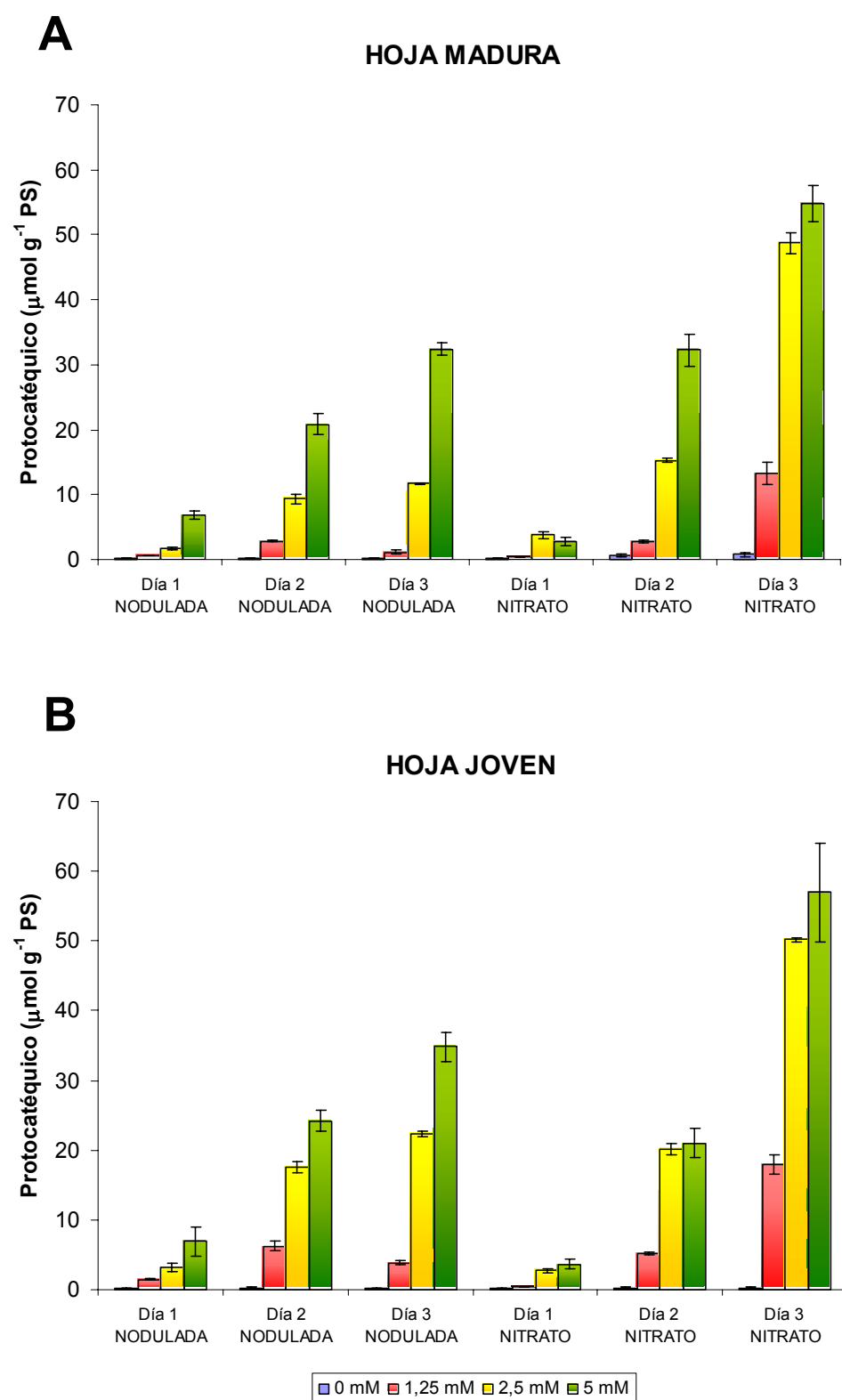


Figura 29: Contenido en ácido protocatéquico ( $\mu\text{mol g}^{-1} \text{PS}$ ) en hojas de *Lupinus albus* tratadas con glifosato (1,25; 2,5 y 5 mM. A) Hoja madura. B) Hoja joven. Los valores son la media de tres medidas. Las barras indican el error estándar.

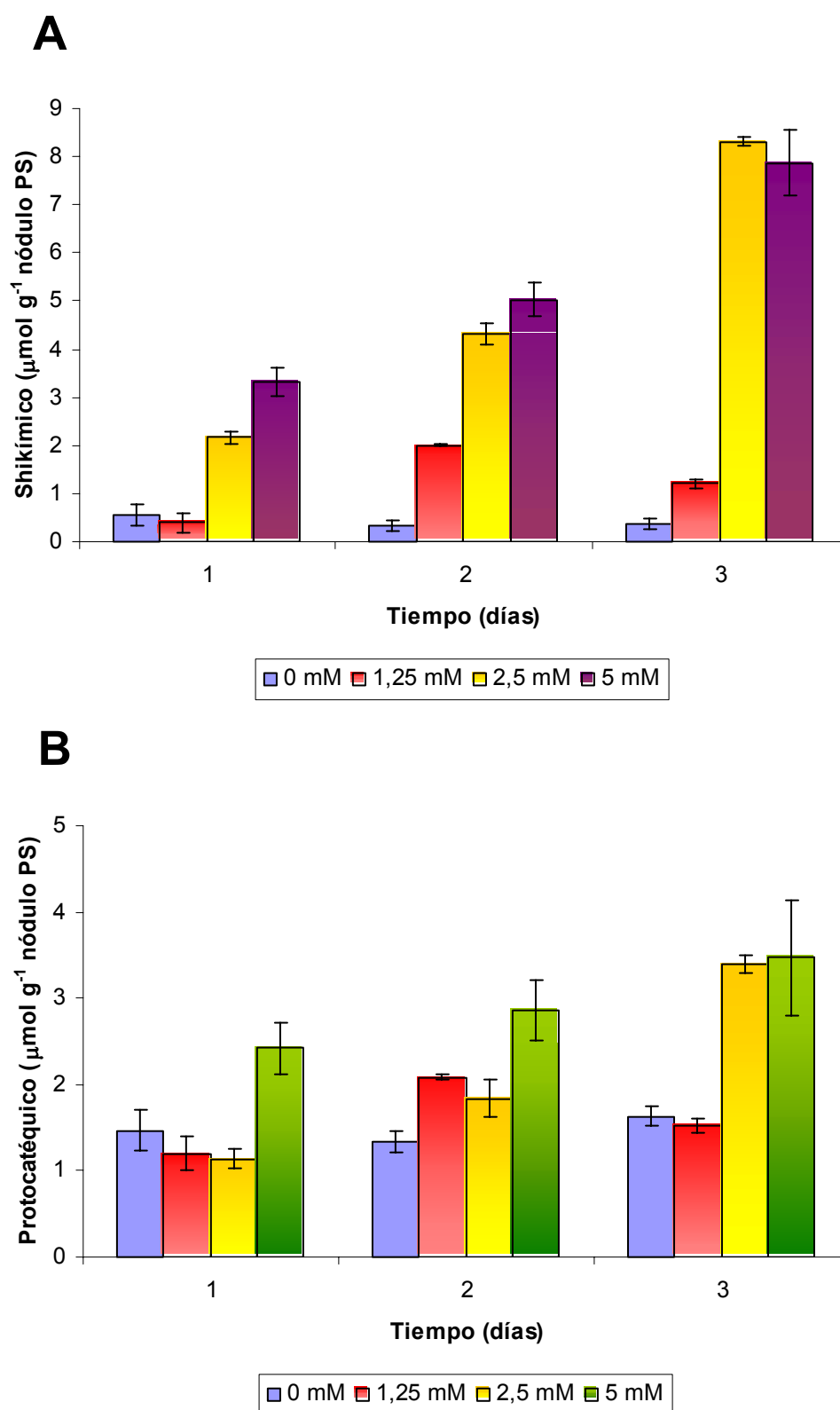
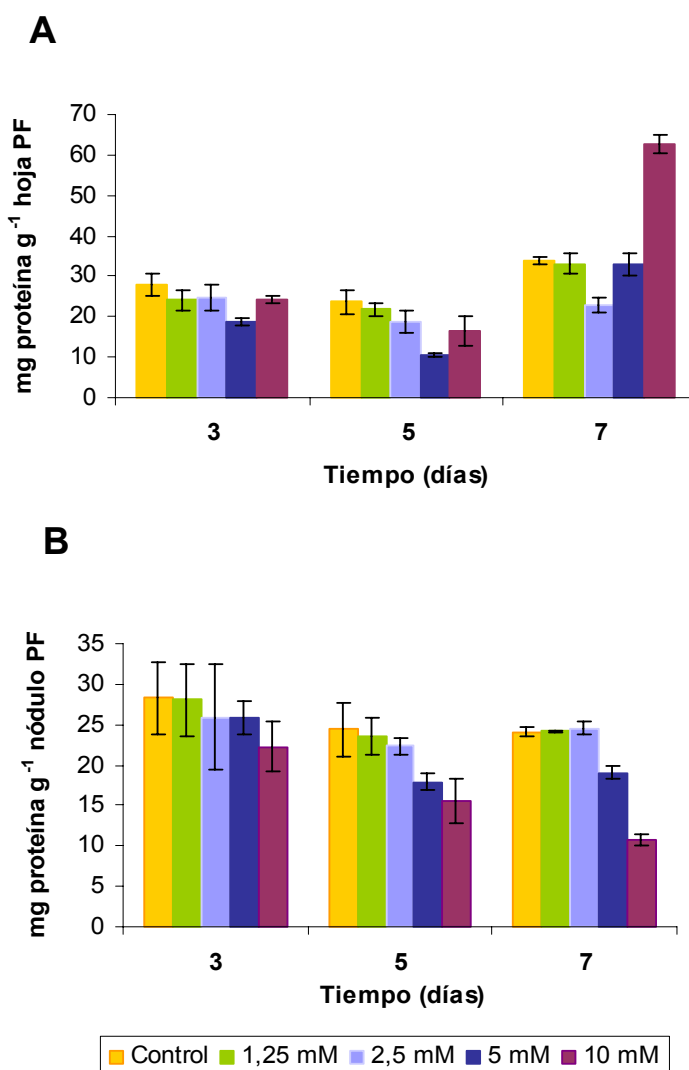


Figura 30: Contenido en ácidos fenólicos ( $\mu\text{mol g}^{-1}$  PS) en nódulos de *Lupinus albus* inoculados con la cepa ISLU16 y tratados con glifosato (1,25; 2,5 y 5 mM. A) Contenido en ácido shikímico. B) Contenido en ácido protocatéquico. Los valores son la media de tres medidas. Las barras indican el error estándar.

En los nódulos el efecto del glifosato fue igualmente rápido aunque la acumulación de ácidos fenólicos fuera mucho menor (fig. 30). El ácido shikímico fue del orden de 2-3 veces menor que en hojas y el protocatéquico del orden de 2-15 veces, esto indicaría una menor traslocación del herbicida desde las hojas donde se aplica hasta los sumideros consuntivos como el nódulo. Esta acción más retardada del herbicida provoca, al contrario que en hojas, una acumulación de shikimato mayor que de PCA (1,5-2 veces). La acumulación de shikimato es estadísticamente significativa a partir de 1 día con la menor concentración ensayada, 1,25 mM, aumentando a los 3 días con 5 mM, 20 veces su valor con respecto al control (fig. 30A), mientras que la acumulación de protocatéquico es significativa a partir de 1 día a la concentración de 5 mM, aumentando a los 3 días aproximadamente 2 veces su valor (fig. 30B).

### 7. Diferencias en el contenido y en el patrón de acumulación proteico en plantas de *Lupinus albus* tratadas con glifosato

El contenido de proteína, se determinó en las muestras de la fracción soluble (citósol), de hojas, nódulos y del bacterioide, a los 3, 5 y 7 días de exposición (fig. 31).



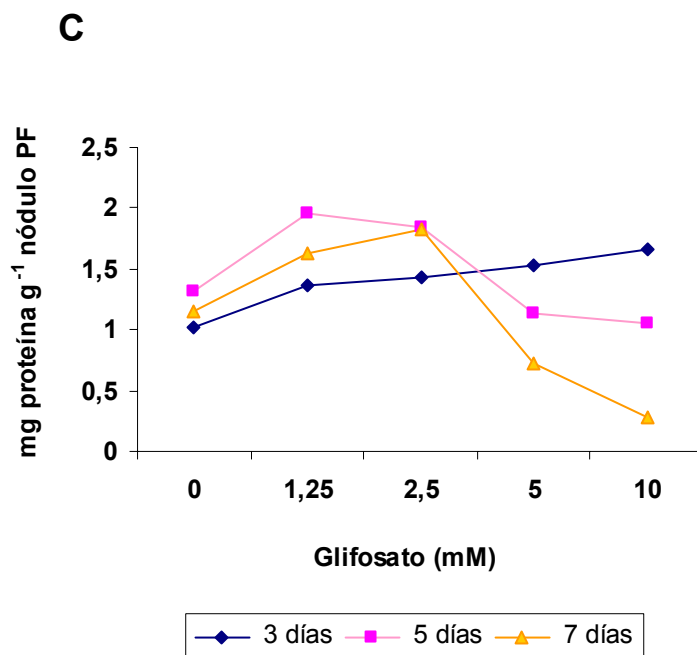


Figura 31: Efecto del glifosato sobre el contenido proteico en plantas de *Lupinus albus*. A) Contenido proteico en hojas. B) Contenido proteico del citosol vegetal en nódulos. C) Contenido proteico del citosol bacteroidal.

En el estudio del contenido proteico a tiempos cortos de exposición, 3 días, no se observaron cambios con diferencias significativas respecto a los controles, tanto en hojas y nódulos como en bacteroides. Sin embargo, a tiempos de exposición largos, se observó una reducción del contenido proteico del citosol vegetal y del citosol bacteroidal, significativo a partir de concentraciones mayores de 2,5 mM.

En el citosol vegetal, como se representa en la figura 31, a los 7 días, la concentración de proteína experimenta una inhibición del 20% con la concentración de 5 mM con respecto a los controles, que llega a caer hasta un 50% a la mayor concentración aplicada, sin embargo en hojas la tendencia de acumulación proteica es ascendente, a partir de 2,5 mM, observándose en este caso diferencias significativas solamente en el tratamiento de 10 mM a los 7 días.

En presencia de glifosato, el citosol bacteroidal se vió más afectado en el contenido proteico que el vegetal, observándose una inhibición de aproximadamente el 38% en 5 mM y de hasta el 76% en 10 mM.

Los extractos de la planta (hojas, nódulos y bacteroides) tratados con herbicida y de la bacteria crecida en medio con glifosato, fueron analizados mediante electroforesis desnaturalizante (SDS-PAGE), observándose un patrón de acumulación proteica diferente dependiendo de la dosis aplicada, del tiempo de exposición y del órgano de la planta.

El análisis electroforético de las proteínas solubles de hojas muestra la presencia de 2 polipéptidos mayoritarios correspondientes a la subunidad grande (Sg) y pequeña (Sp) de la la enzima cloroplástica D-ribulosa-1,5-bifosfato carboxilasa/oxigenasa (EC 4.1.1.39. Rubisco). La cuantificación del contenido proteico de la subunidad grande mediante *Western blot*, no experimentó grandes diferencias en el análisis densitométrico a los 4 días, únicamente se marco una reducción del 26% en la mayor concentración de tratamiento 10 mM (fig. 32).

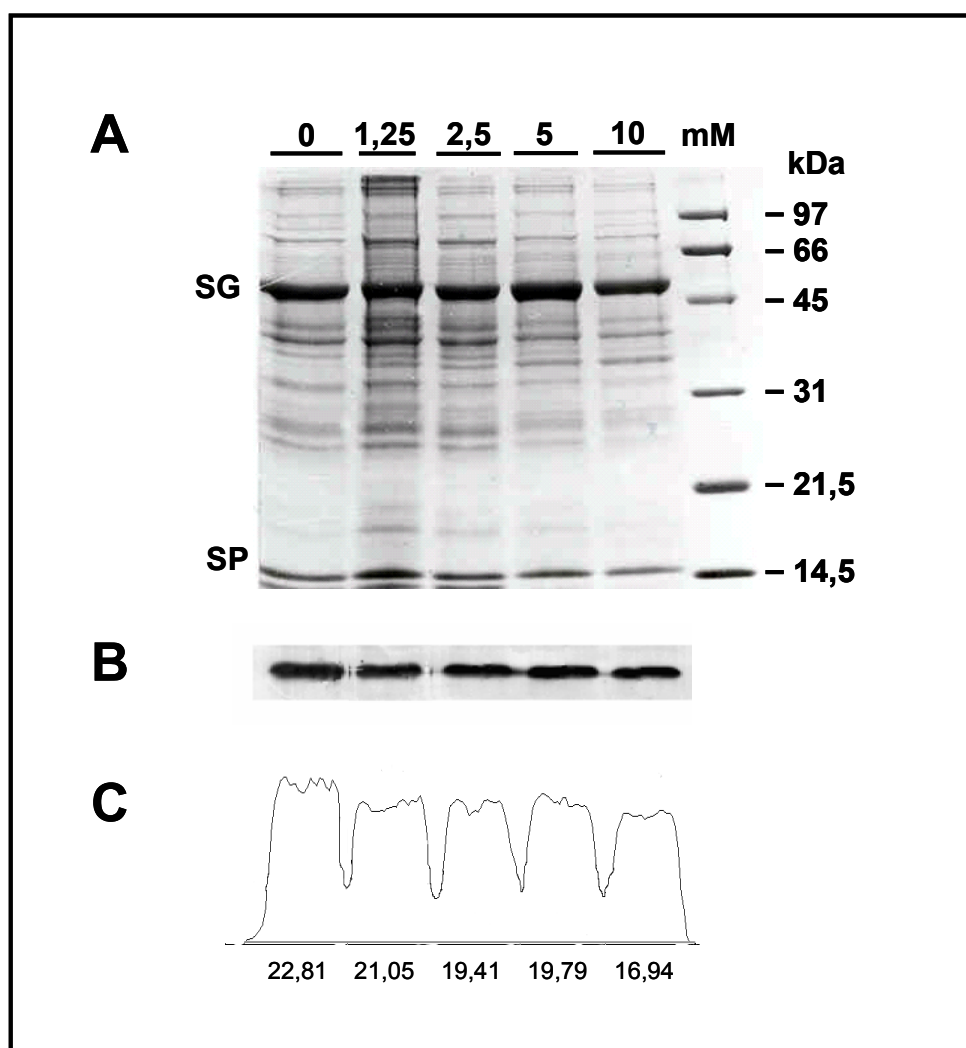


Figura 32: Inmunodetección de la enzima Rubisco a los 4 días de la aplicación del glifosato (mM). A) Electroforesis SDS-PAGE de proteínas solubles del citosol en hoja de *Lupinus albus*. SG: 55 kDa, SP: 13 kDa. 35 µg de proteína por pocillo. B) Western blot de Rubisco. C) Densitograma.

De la misma forma en el patrón de proteínas del nódulo se detectaron cambios ligeros en los niveles proteicos solubles (fig. 33). El descenso solamente se hacia patente a mayores dosis y tiempos de exposición, como se muestra en la figura 33, en la concentración 10 mM a los 7 días.

## Resultados

La técnica de inmunodetección mediante *Western blot* permitió la identificación y cuantificación en el análisis del contenido de proteínas implicadas en la regulación a la difusión de oxígeno, las glicoproteínas reconocidas por los anticuerpos monoclonales MAC 236, MAC 265 y leghemoglobina.

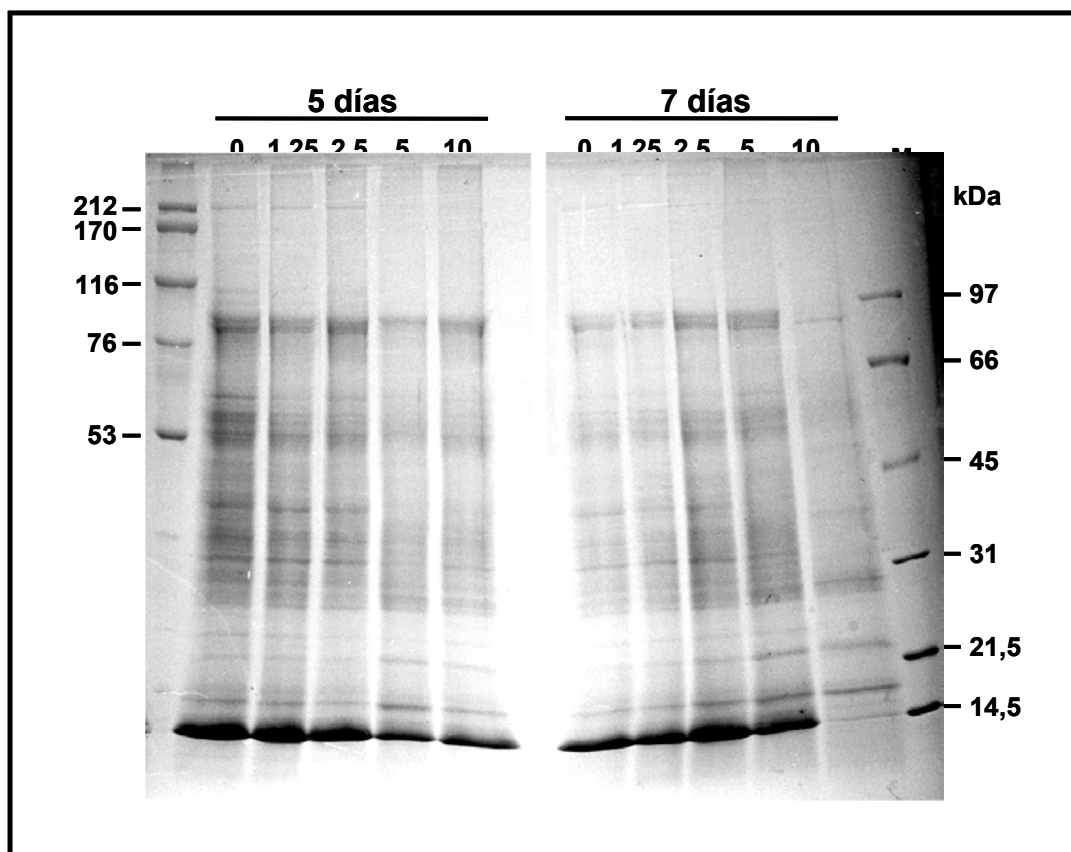


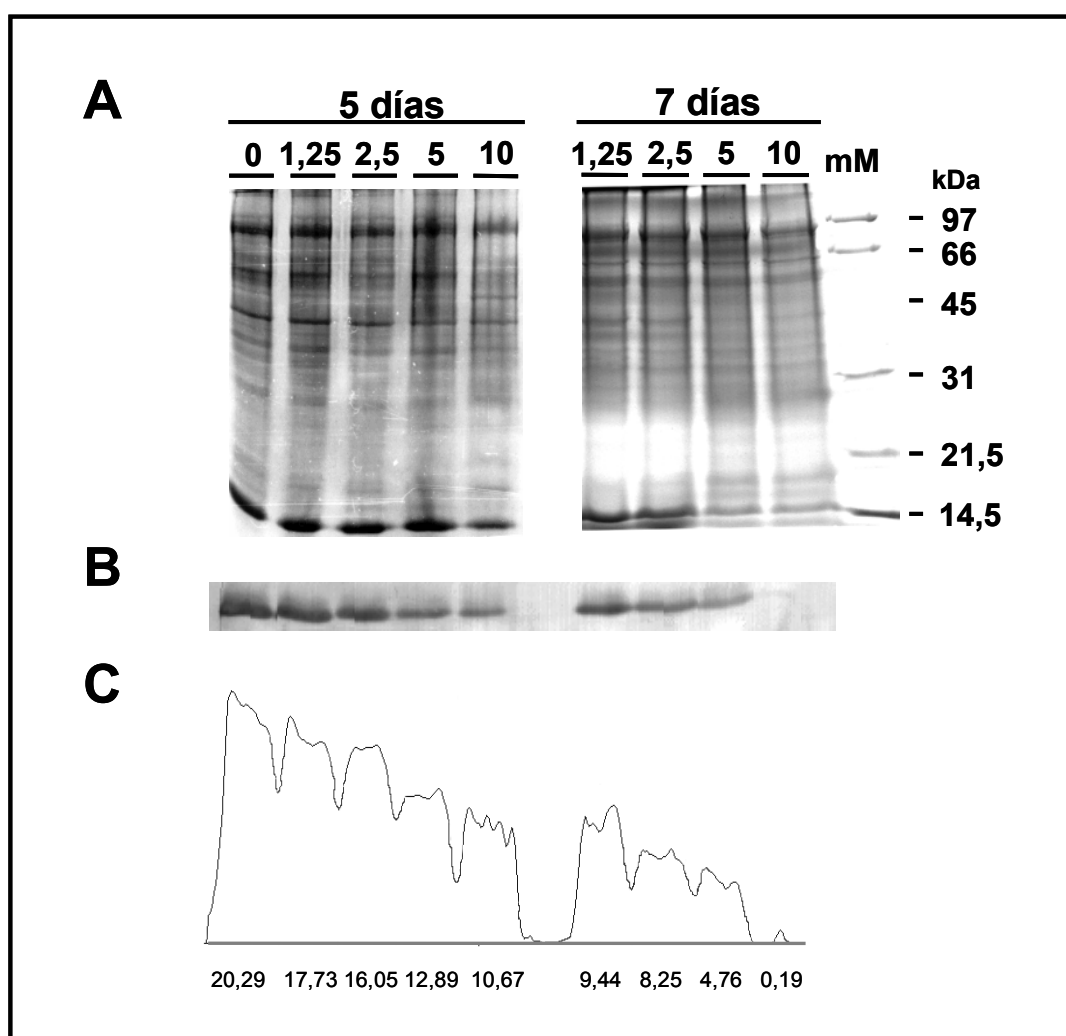
Figura 33: Electroforesis SDS-PAGE de proteínas del citosol nodular, 5 y 7 días después del tratamiento con diferentes concentraciones de glifosato (mM). 100  $\mu$ g de proteína separada en un gel de gradiente del 7% al 18% de acrilamida. Los números de la derecha indican los marcadores de baja masa molecular en kDa y los de la izquierda los marcadores de alta masa molecular.

En el patrón electroforético de proteínas nodulares citosólicas mediante SDS-PAGE, a 3 días de la aplicación, no se observaron diferencias en las intensidades de las bandas con las distintas dosis de herbicidas, sin embargo a 5 días de tratamiento, se aprecia en el componente mayoritario de 14 kDa (la leghemoglobina), una reducción del 36% y 47% en concentraciones de 5 y 10 mM, respectivamente, con respecto al control. Después de 7 días la disminución del contenido de leghemoglobina se duplicó, siendo del 76% y 99% en concentraciones de 5 y 10 mM (fig. 34), destacando la desaparición de un polipéptido de aproximadamente 38 kDa, en concentraciones de 5 y 10 mM de glifosato.



En el contenido de glicoproteínas reconocidas por MAC 236 y 265, se experimentó una tendencia similar al contenido proteico del citosol nodular, las glicoproteínas disminuyeron más drásticamente después de tratamientos prolongados y dosis altas, hasta una cantidad en glicoproteína prácticamente inexistente a 10 mM de glifosato durante 7 días desde la aplicación (figura 35 y 36).

En cuanto a la glicoproteína reconocida por el anticuerpo monoclonal MAC 236, tanto en 5 días como en 7 días de actuación del tratamiento, se redujo en un 35% a dosis bajas (1,25 y 2,5 mM), hasta prácticamente contenido cero a 10 mM de glifosato (fig. 35).



*Figura 34: Inmunodetección de Leghemoglobina a los 5 y 7 días después de la aplicación del glifosato (mM). Electroforesis SDS-PAGE de proteínas de citosol nodular. 35 µg de proteína por pocillo transferida a membrana de nitrocelulosa e inmunodetectada con el anticuerpo policlonal de leghemoglobina de lupino. A) Electroforesis. B) Western blot. C) Densitograma.*

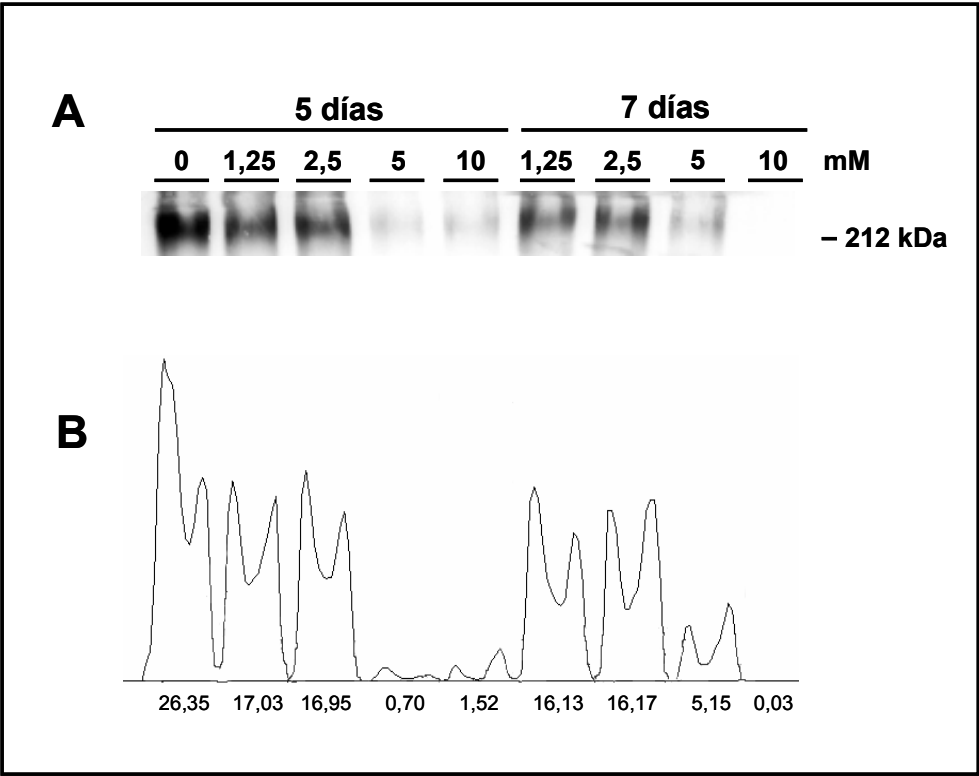


Figura 35: Inmunodetección de glicoproteína reconocida por el anticuerpo monoclonal MAC 236 a los 5 y 7 días después de la aplicación del glifosato (mM). A) Western blot. B) Densitograma.

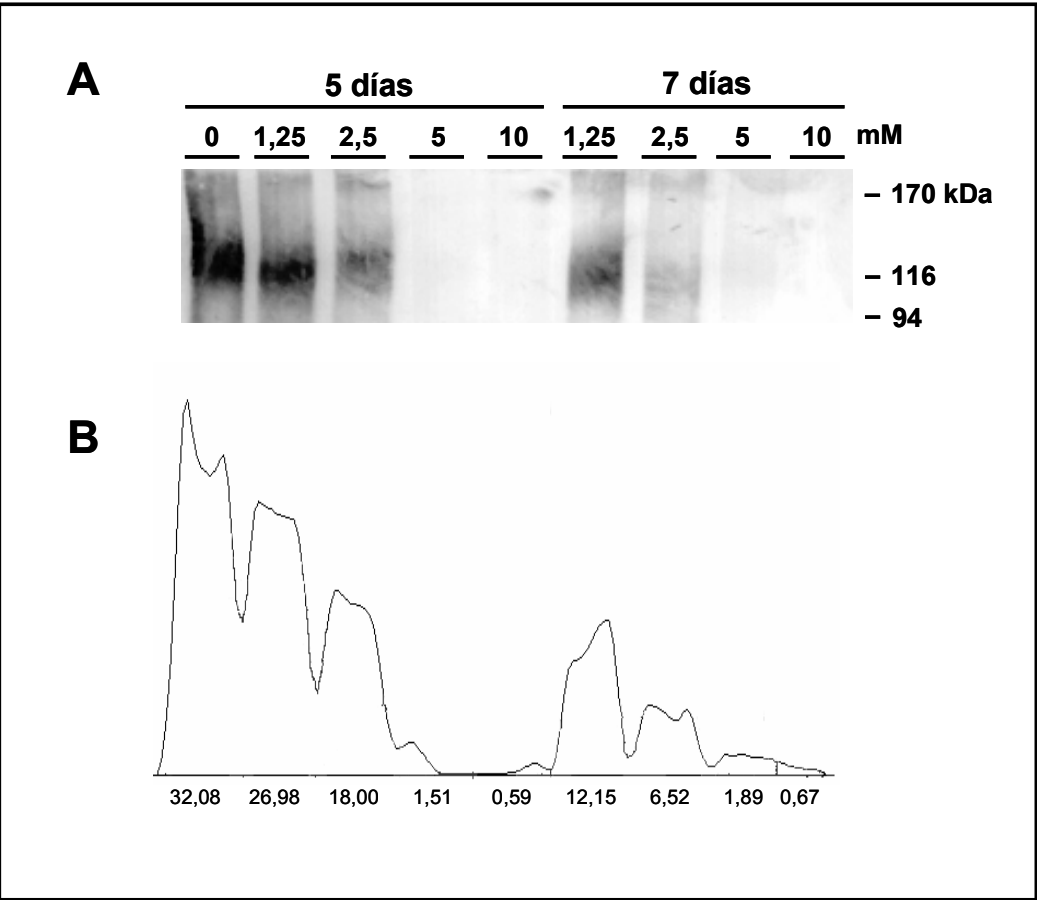


Figura 36: Inmunodetección de glicoproteína reconocida por el anticuerpo monoclonal MAC 265 a los 5 y 7 días después de la aplicación del glifosato en concentraciones mM. A) Western blot. B) Densitograma.

Por el contrario, la glicoproteína reconocida por el anticuerpo MAC 265 es más sensible al efecto del herbicida, siguiendo una línea de descenso progresiva desde una reducción del 15% a 1,25 mM, 43% a 2,5 mM hasta prácticamente una inhibición total a 5 mM (95%) y a 10 mM (98%) con 5 días de actuación del herbicida. El efecto del herbicida es más patente después de 7 días de tratamiento, en donde se detecta un descenso del 62%, sólo con 1,25 mM (fig. 36B).

En el citosol nodular bacteroidal, la aplicación del herbicida a las mayores concentraciones (5 y 10 mM) provocó el descenso de varios polipéptidos, como se muestra en la figura 37, si bien la más destacada modificación en el patrón proteico bacteroidal fue la inducción de la expresión de dos nuevos polipéptidos de aproximadamente 21 y 44 kDa de masa molecular, a partir de 4 días de la aplicación del tratamiento. Sin embargo el patrón proteico de la bacteria en vida libre no se modificó a la concentración ensayada (31,25  $\mu$ M), concentración de glifosato en la que no se inhibió su crecimiento. Esta expresión ésta en correlación con los niveles de acumulación del ARN (fig. 47).

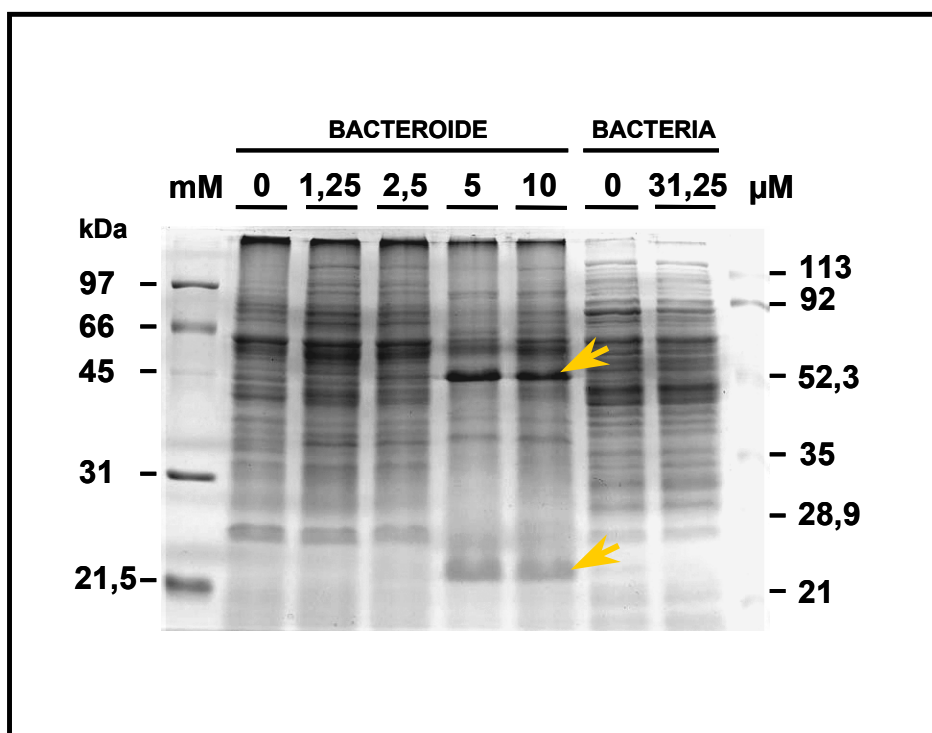
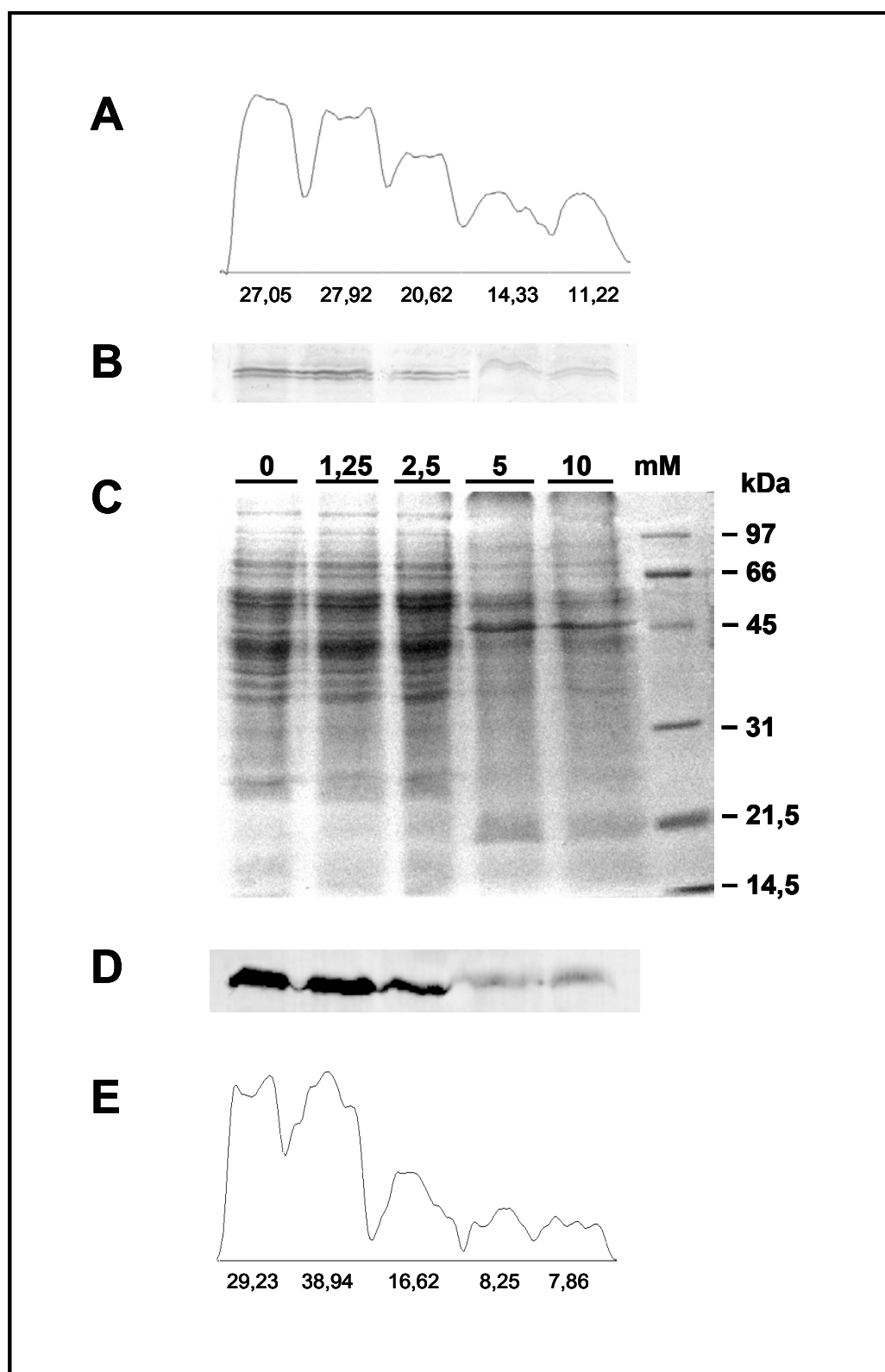


Figura 37: Electroforesis SDS-PAGE de proteínas del citosol bacteroidal a los 7 días de la aplicación del glifosato (izquierda) y del citosol bacteriano (derecha). 35  $\mu$ g de proteína por pocillo. Los números de la derecha e izquierda indican la masa molecular en kDa.



*Figura 38: Inmunodetección de la enzima Nitrogenasa a los 4 días de la aplicación del glifosato en concentraciones mM. A) Densitograma del componente I de la nitrogenasa. B) Western blot del componente I. C) Electroforesis SDS-PAGE de proteínas de citosol bacteroidal. 35 µg de proteína por pocillo. D) Western blot del componente II de la nitrogenasa. E) Densitograma del componente II.*

En la figura 38 se muestra el patrón de los niveles proteicos en bacteroides en donde, el contenido del componente I de la enzima nitrogenasa o proteína MoFe y el componente II o proteína Fe, presentaron un comportamiento similar no detectándose variación cuantitativa hasta dosis altas de 5 y 10 mM durante 4 días de exposición. Del densitograma (fig. 38A y E), de ambos componentes, se refleja un mayor efecto del herbicida sobre el componente II, al destruirse en un 73% a la dosis 10 mM frente a una inhibición del 58% del componente I de la nitrogenasa, a los 4 días, este dato corresponde con la medida de la actividad nitrogenasa, si bien la destrucción del enzima no se produce hasta los 4 días y con las más altas concentraciones, mientras que a las 24 horas con la mínima concentración ensayada ya se puso de manifiesto la caída tan drástica de la actividad enzimática.

## 8. Caracterización del polipéptido BLpp bacteroidal de 44 kDa

En el estudio del efecto del glifosato sobre el metabolismo proteico de nódulos, como se ha indicado anteriormente, la mayor alteración observada consistía en la detección de un nuevo polipéptido de 44 kDa (BLpp) en el citosol bacteroidal que no había sido detectado en bacteroides procedentes de plantas sin tratar con herbicida (apartado 7 de Resultados, fig. 37). Con objeto de identificarlo, conocer su naturaleza y establecer su funcionalidad en la respuesta del microsimbionte frente al tratamiento con herbicidas, se llevó a cabo, inicialmente la secuenciación de su región N-terminal.

### 8.1. Análisis de la secuencia aminoacídica de la región N-terminal de BLpp

La proteína BLpp fue purificada a partir del extracto de proteínas solubles del microsimbionte. Las proteínas solubles fueron separadas por SDS-PAGE y transferidas a una membrana de PVDF. Una vez identificada la banda correspondiente a dicha proteína, se recortó de la membrana de PVDF y se determinó la secuencia aminoacídica de los 20 aa de su extremo N en un secuenciador automático de proteínas. El análisis computacional de los 20 aminoácidos del extremo N del polipéptido reveló que la secuencia es idéntica a dos proteínas de *Bradyrhizobium japonicum* cepa USDA110, descritas como “posibles” porinas (Bjpp, Kaneko *et al.*, 2002), así como a otras proteínas descritas en la base de datos BLAST. Dada su similitud con Bjpp se acordó en llamarla BLpp (“posible” porina de *Bradyrhizobium* sp. (*Lupinus*)).

En la figura 39 se muestra el alineamiento múltiple de las secuencias aminoacídicas de los extremos N de la proteína BLpp con las correspondientes secuencias de mayor homología de otras especies bacterianas, disponibles en las bases de datos, obtenido mediante el programa Clustal W 1.82.

## 8.2. Clonación y caracterización de la secuencia nucleotídica del gen *blpp*

Como paso sucesivo, se procedió a la identificación del gen codificador del polipéptido, mediante la determinación de la secuencia nucleotídica completa de dicho gen.

La determinación de la secuencia nucleotídica completa del gen *blpp* se obtuvo a partir de 4 clones solapantes (fig. 40), que habían sido obtenidos por amplificación con PCR del ADN bacteriano, mediante la técnica de “*Genome Walker*” (apartado 2.20 de Materiales y Métodos). Por digestión con las enzimas de restricción *Dra* I, *EcoR* V, *Pvu* II, *Sca* I y *Stu* I del ADN genómico de la bacteria *Bradyrhizobium* sp. (*Lupinus*) ISLU16, se obtuvieron mezclas de fragmentos del ADN genómico digeridos con dichas enzimas y a los que se había ligado un adaptador en cada extremo del fragmento (genotecas). Cada genoteca fue amplificada por PCR, utilizándose los oligonucleótidos específicos del adaptador, suministrados por el kit (AP1 y AP2) y los específicos del gen *blpp* previamente construidos (1*n*, 2*n*, 3*n* y 4*n*), hasta la obtención de las bandas correspondientes a las regiones del ADN genómico del gen *blpp*. El primer cebador específico, el oligonucleótido 1*n*, se diseñó a partir de la zona conservada de las 9 secuencias nucleotídicas deducidas de las aminoácidas de mayor homología a la región N-terminal.

<b><i>Bradyrhizobium</i> sp. (<i>Lupinus</i>)</b>			NH <sub>2</sub> - <b>YVKICS</b> LYGAGFYYPGTD <b>T</b>
* <i>B. japonicum</i> USDA110 (NP_7735528)	100%	NH <sub>2</sub> -	<b>YVKICS</b> LYGAGFYYPGTD <b>T</b>
<i>B. japonicum</i> USDA110 (NP_771716)	100%	NH <sub>2</sub> -	<b>YVKICS</b> LYGAGFYYPGTD <b>T</b>
<i>Rhodopseudomonas palustris</i> (ZP_00012921)	95%	NH <sub>2</sub> -	<b>YVKV</b> <b>C</b> SLYGAGFYYPGTD <b>T</b>
<i>B. japonicum</i> USDA110 (NP_771623)	90%	NH <sub>2</sub> -	<b>YVKIC</b> <b>T</b> LYGAGFYYPG <b>S</b> D <b>T</b>
* <i>Rhodopseudomonas palustris</i> (ZP_00010135)	90%	NH <sub>2</sub> -	<b>YVKV</b> <b>C</b> SLYGAGFYYPGTD <b>T</b>
* <i>Rhodopseudomonas palustris</i> (NP_947761)	90%	NH <sub>2</sub> -	<b>YVKV</b> <b>C</b> SLYGAGFYYPGTD <b>T</b>
* <i>Mesorhizobium loti</i> (CAD31441)	80%	NH <sub>2</sub> -	<b>YVKIC</b> DVYGAGFYYPGT <b>E</b> <b>T</b>
* <i>Mesorhizobium loti</i> (NP106908)	80%	NH <sub>2</sub> -	<b>YVKIC</b> DVYGAGFYYPGT <b>E</b> <b>T</b>
* <i>Mesorhizobium loti</i> (CAD31593)	75%	NH <sub>2</sub> -	<b>YVKIC</b> DVYGAGFYYPGT <b>E</b> <b>T</b>

Figura 39: Alineamiento múltiple de las secuencias aminoácidas de la región NH<sub>2</sub> del polipéptido BLpp detectado en el patrón proteico de bacteroides de plantas tratadas con glifosato con un grupo de proteínas de diferentes especies bacterianas. La numeración en azul indica el porcentaje de identidad con BLpp. El \* señala las proteínas descritas en los bancos de datos como “posibles porinas”.

El análisis de la única banda visualizada en la amplificación de la genoteca *Stu* I, reveló que correspondía a un fragmento de 632 pb del gen *blpp*. Este fragmento

posteriormente clonado fue identificado a través del alineamiento con las secuencias de mayor homología descritas en la base de datos mediante el programa BLAST.

Para completar la secuenciación del gen *blpp* fue llevada a cabo una nueva amplificación utilizando el cebador *2n*, diseñado a partir de la secuencia del fragmento de 632 pb. El resultado de la amplificación fue la visualización de dos bandas a partir de las genotecas *EcoR* V y *Pvu* II. La secuenciación de estas bandas, posteriormente clonadas reveló que la banda de 468 pb de la genoteca *Pvu* II correspondía a la secuencia que codificaba la región N-terminal de BLpp. Análogamente, utilizándose los cebadores *3n* y *4n* y como resultado de la amplificación se visualizaron dos bandas de las genotecas *EcoR* V y *Stu* I de 981 pb y de 969 pb respectivamente, que después de ser clonadas y analizadas se comprobó que correspondían a las secuencias que codificarían la región C-terminal de BLpp. El solapamiento de estas secuencias con las anteriormente analizadas, completaron la secuencia nucleotídica de 2.467 pb (fig. 40)

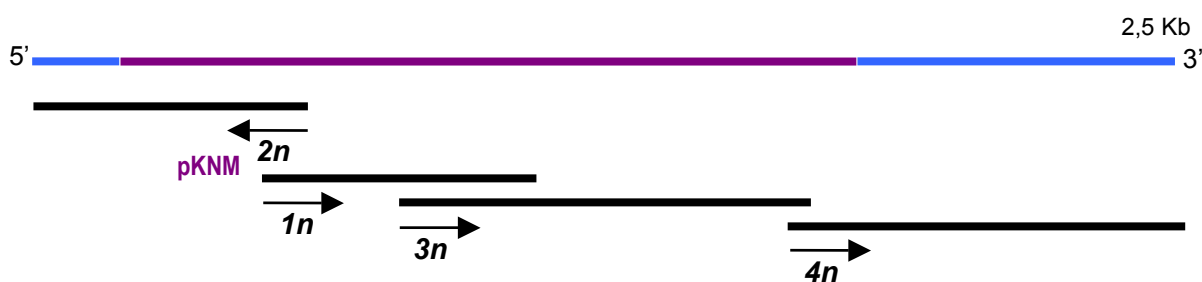


Figura 40: Estrategia de clonación del gen que codifica para BLpp. La secuencia codificadora de la proteína se representa con una línea magenta y la no codificadora en azul. La posición y sentido de los oligonucleótidos *1n*, *2n*, *3n* y *4n* utilizados en la clonación se representan con flechas.

El análisis de la región de 2.467 pb, reveló la presencia de un marco de lectura abierta, desde el codón de inicio (ATG) hasta el codón de terminación (TAA), que codificaría un polipéptido de 506 aminoácidos, con una masa molecular de 52.922 Da y un punto isoelectrónico teórico de 7,59. Dicho tamaño se corresponde con el estimado en el análisis electroforético (fig. 37).

En la figura 41, se muestra la región codificante del gen y no codificante, así como la secuencia aminoacídica deducida tras realizar la traducción de su pauta abierta de lectura.

### 8.3. Análisis de la secuencia nucleotídica y aminoacídica deducida de *blpp*

El análisis de las secuencias nucleotídicas de mayor homología con el gen *blpp* depositadas en las bases de datos, reveló la existencia de genes homólogos que codifican las porinas Omp2a y Omp2b, de diferentes especies del género *Brucella* (*B. abortus*, *B. canis*, *B. melitensis*, *B. neotomae*, *B. ovís* y *B. suis*), así como otros genes bacterianos de diferentes especies que comparten con *blpp* una elevada identidad, como *Brucella* sp. B202R (AF027601) con un 68%, *Shinorhizobium meliloti* (SME591785) con un 64,2%; *Mesorhizobium loti* (ML0672112) con un 62,3% y *Agrobacterium tumefaciens* (AE009398) con un 63,4%. No obstante las secuencias de mayor homología, 66,8% y 65,7% de identidad respectivamente con *blpp*, corresponden a dos genes de *Bradyrhizobium japonicum* cepa USDA 110 (AP005953; AP005960).

En la figura 42 se muestra el alineamiento múltiple de BLpp, con las tres proteínas de mayor homología. La comparación de la secuencia aminoacídica deducida de BLpp muestra que comparte un 62,5% de identidad en sus residuos con una proteína descrita como una “posible” porina de *Bradyrhizobium japonicum* cepa USDA 110 (Bjpp, número de acceso: NP 771623), un 60,7% con Bjhp y un 59,7% con Bjpp2.

La búsqueda en la base de datos nos reveló la existencia de homólogos en otras especies bacterianas como en: *Rhodopseudomonas palustris* (CAE27860) con una identidad del 51%, *Mesorhizobium loti* (Q985C5) con 31%, la porina Omp2b de *Brucella suis* (Q9KH74) y de *B. melitensis* (Q45312) con un 29%, *Rhizobium leguminosarum* (Q05811) con un 31%, *Shinorhizobium meliloti* (Q92R60) con un 28,4% y *Agrobacterium tumefaciens* (Q8U6W3) con un 32,5%, porcentajes que nos indican que el análisis de la homología de BLpp muestra identidad con secuencias de otras porinas, proteínas con “posibles” dominios conservados en diferentes géneros bacterianos.

El alineamiento múltiple de la secuencia aminoacídica deducida BLpp con las secuencias aminoacídicas de mayor homología muestra la existencia de un dominio de porinas altamente conservado de 87 aa. Se encuentra situado a 30 aa de la región N-terminal. La comparación de la secuencia aminoacídica del “posible” dominio de porinas de BLpp indica que comparte un 70% de identidad con Bjpp, un 71% con Bjpp2 y un 68% con Bjhp, lo que demostraría una elevada similitud entre las secuencias aminoacídicas de este “posible” dominio típico de porinas.



1	ctagtcgtaagtggacgcgcgagggcgccctcgaagtctgtccgtcaatcacctgggtcggg	
62	tggggctcaacgcagcggatctttgaagcgcgcgacacattcaacttgagggttattc	
122	<b>M K L T R S V L L G S A A M F A A G A</b>	20
182	<b>ATG</b> AAACTGACACGAAGCGTTCTGCTTGGTTCCGCGGCAATGTTTTCGGCCGCCGCGCA	40
242	<b>Q A A D L P V K A K A I E Y V K I C S L</b>	60
302	CAGGTCGCGGATCTTCCGTGAAGCGAAGCGATTGAATATGTAAAGATTGCTCGCTG	80
362	<b>Y G A G G F Y Y I P G T D T C I K L G G Y</b>	100
422	TATGGTGCCGGTTCTACTACATCCCTGGAACGCACCTGCATCAAGCTCGGGGGCTAT	120
482	<b>L R A S G L T G L G T N G I Y S T P D S G V</b>	140
542	TTGCGCGCCTCGCTAGGTCTCGGGAATAACGGTATTTATTTCGACTCCAGACACGGAGTT	160
602	<b>G A A R N R L S N Y Y T A Q S R V D L S</b>	180
662	GGCGCTGCCGAAACCGCTCAGCAACTATTACACTGCTCAATCCCGTGCACCTTAGC	200
722	<b>V D T R T A T E Y G V V R T Y W E G V N</b>	220
782	GTCGATACGCTACGGCGACCGAGTACGGCGTGGTGCGTACTTACTGGGAAGGCGTGAAC	240
842	<b>T W T T G G Y T G T G T T A V N G A T S</b>	260
902	ACCTGGACAACGGCGGTACACCGGCACCGGACAACCGCGGTTAATGGAGCGACTTCC	280
962	<b>Y T T S I A S Q V S A G S L G G V Y A F</b>	300
1022	TATACAACCTCGATCGCTCTCAGGTTTCTGCGGTTTCGGTCTTATTACGCCTTC	320
1082	<b>I Q F A G L T I G K A Q S Q F T A P W A</b>	340
1142	ATCCAATTTGCCGGGCTGACGATCGGCAAGGCTCAGTCTCAGTTCAGTGCACCATGGCA	360
1202	<b>N Y P A N S F D G L P G G G G G W E P V T</b>	380
1262	AACATCTCCGGCAACAGCTTTTGCGLTTTGCCGGCGCGGGGGCTGGGAGCTGCACC	400
1322	<b>Q F T Y T A D F G Q G I S A S F S A Q D</b>	420
1382	CAATTACCTATACGGCCGACTTTGGTCAGGGCAGTCAGTGCTTCTCTCGGCTCAGGAT	440
1442	<b>Q V A N Y Q T T I W N V S G A T A A G L</b>	460
1502	CAGGTTGCCAATTACCAAACGAACATTTGGAACGTGAGTGGGCAACCGTGCAGGCCTG	480
1562	<b>A T G A Y G A A N D F G G T R A P D L V A</b>	500
1622	GCGAGCGGGGCTATGTTGCCAATGACTTCGGCGGCACGCGCGCGGCGGACTTTTGCA	520
1682	<b>M L R V D Q A W G L F Q A S A A A H D N</b>	540
1742	ATGCTTCGTGTCGATCAGGCTTGGGTTCTTTTCAGGATATCGGCGCGCATGATAAT	560
1802	<b>H A N Y Y G A D T T T G H P G D K W G W</b>	
1862	CATGCCAACTACTATGGCGCCGATGGAACGACCGGCCACCCCGCGCACAGTGGGGTTGG	
1922	<b>A G Q L A L S I K N I P T G A G D T I N</b>	
1982	GCGGGTCAACTGGCTCTTCGATCAAGAACATTCCGACTGGCGCGGGTGACACGATCAAT	
2042	<b>M S G V Y T N G A S R Y N F Q S Y M S</b>	
2102	ATGAGCGCGGTGACACCAATGGCGCAAGCGCTACAACCTCCAGTTCGATATGTCGAGC	
2162	<b>T F A M Y G G T S A P G A Y Q S V G L A</b>	
2222	ACCTTCGCGATGTATGGCGGCACAAGCGCACCCCGAGCTTACCAGAGCGTCGGTCTTGCT	
2282	<b>G L S D S V F V T G A G Q Q L T T T Y G</b>	
2342	GGTCTCCGACTCGGTGTTCTGTTACCGCGCTGGCCAGCAGTTGACGACTACCTATGGA	
2402	<b>Y Q G G Y T H N W D P H W N S V Y G G</b>	
2462	TACCAAGGCGGTGACACCACTGGGATCCCACTGGAATAGTAGCGTCTATGGCGGC	
2522	<b>L G A V R Y N N T A K G Y I C G A V V A</b>	
2582	TTGGGTGCCGTGCGATACAACAATACCGCGAAGGGTTATATCTGTGGTCCGCTTGTGCG	
2642	<b>S L A L S T G L A G C N P D F N Y G V V</b>	
2702	AGCCTCGCCTCTCAACGGCTCTCGCCGCTGTAAACCAGATTCAATTATGGTGTGCTT	
2762	<b>G L V T R W T P V K N L S F T A D L A Y</b>	
2822	GGTCTGGTACGCGCTGGACTCTGTCAAAAATCTCTCCTTACGGCCGACCTCGCATAC	
2882	<b>V M L D Q K Y A S G S T V A L P L Q A S</b>	
2942	GTAATGCTCGACAGAAGTATGCGAGCGGGAGACCGTGCGCGTGCAGCGTCAAGCGAGT	
3002	<b>I A K P G C A G Y E L K D Q N A L T L L L</b>	
3062	ATCGCAAGCCCGGTACCGCTACGAACCTGAAGGATCAAAATGCGCTTACGCTGCTGCTG	
3122	<b>R A Q R N W *</b>	506
3182	CGTGCGCAGCGCAACTGGTaaagttttcaaacgagcgcgaaggagagataaagggttcatt	
3242	agatcgcggcggttaacctccaagaaggccccccgcatcgccgcgcggggcctttgattg	
3302	gatcgcgaagtctctcgagcgcgcgcctggccattcaagcaagtagtagcatccataaatg	
3362	tgatgatctttgacgacggaagaagcaggggagatgagcagccttaagtgcgaacacatccg	
3422	cggatcgccagcatcacatctttggcggaatgacgagctgcgcgggataactcagatcgatg	
3482	cgcgagctcccgatcgaaactgcgcgcgagcgtctcgatcttcgctcaaccttagcatcga	
3542	tgccgagctacgcgtcgccgcgacggagccagcgccttgatgttacgcgctgtaacgagac	
3602	caagcgcgcgattagaaattgacttgtgtctaacgcctaacgctcgcagcgccttgagagg	
3662	cttggggctttaaacccgcaaatcaacgtccagcgagcgcgcgcgcttgtaactgcgagac	
3722	aatatgctccgcgaaaagcaagattctgcagcaatagctcgtctgaccgccacaatatg	
3782	cccacatataacaggaatggccttacgcctaattctctcaggcccggtgaggcttggtc	
3842	ccggaggctcagaggaggcgcgcttcgacaatgcttcgcgcggaatatttgactgcgac	
3902	ggccttggcctggccgagttgctctatcgtaagcaggtctccccgcttgatttgatgaac	
3962	tgccgactggaagtgcgcaacagcgaatccaggaccagcccgggcgctcgaccacgcg	
4022	tgcctt 2467	

Figura 41: Secuencia de nucleótidos del gen blpp y la secuencia aminoacídica deducida de BLpp. Los números de la izquierda señalan la posición de nucleótido de la secuencia y los de la derecha el número de aminoácidos. La secuencia codificante se señala en mayúsculas y la no codificante en minúsculas. Los codones de iniciación y terminación de la proteína están señalados en color rojo, así como los aminoácidos de la traducción. En color azul se indica la secuencia aminoacídica de la región N-terminal de BLpp.

## Resultados

<b>BLpp</b>	-----	-----	-----	-----	-----	MKLTRS <sup>V</sup> LLG	10
Bjpp	-----	-----	-----	-----	-----	MKVVKSL <sup>L</sup> LLG	10
Bjhp	MVRLSPSRSA	GVSEGA <sup>K</sup> RLS	GELRD <sup>K</sup> GTNL	RVSSPSGSGT	FPIEQ <sup>T</sup> WRFN	MKLVKSL <sup>L</sup> LLG	60
Bjpp2	-----	-----	-----	-----	-----	MKLTK <sup>L</sup> TLFLG	10
<b>BLpp</b>	SAA-MFAAAG	ACAADLPVKA	KATEYVKICS	LYGAGFYIIP	GTDTCIKLGG	YLRA <sup>S</sup> LGLGT	69
Bjpp	TAAGLI <sup>A</sup> VGG	ACAADLPVKA	KAVEYVKICT	LYGAGFYIIP	GS <sup>D</sup> TCIKLGG	YLRAE <sup>V</sup> ALNA	70
Bjhp	SAAGLI <sup>A</sup> VGG	ACAADLPVKA	KAVEYVKICS	LYGAGFYIIP	GTDTCIKLGG	YLRAE <sup>V</sup> ALGT	120
Bjpp2	SAAGLMA <sup>A</sup> SG	AF <sup>A</sup> AADLPVKA	KAVEYVKICS	LYGAGFYIIP	GTDTCIKLGG	YLRA <sup>D</sup> ANLNT	70
<b>BLpp</b>	NGIYSTPD--	--SGVGAARN	RLSNYYTAQS	RVDLSVDTRT	ATEYGVVRTY	WEGVNT <sup>T</sup> WTG	125
Bjpp	GGNYS <sup>A</sup> QYN-	--G-VFAANN	RLTNYYSMRA	REDLNIDTRT	ATEYGVVRTY	FDAV <sup>F</sup> TWTG	126
Bjhp	NSDFTLNQNV	STQGAN <sup>G</sup> ARN	RLTNYYTMRA	REDLNIDTRT	ATEYGVVRT <sup>F</sup>	FDGV <sup>F</sup> SWTTG	180
Bjpp2	NSDFNPNQ--	GGVAGARN	RLMNY <sup>T</sup> TFRA	REDLNIDTRT	ATEYGVVRT <sup>F</sup>	FDGV <sup>F</sup> TWTG	126
<b>BLpp</b>	GYTGTGTTAV	NCATS <sup>Y</sup> TTSI	ASQ-----	-----	-----VS	AGSLGV <sup>Y</sup> YAF	160
Bjpp	NYGGTG--SG	TGATQ <sup>Y</sup> SGTI	GLN----AAG	TGLTGS-GGG	NVNGTDG <sup>N</sup> LS	GGALGV <sup>Y</sup> YAF	179
Bjhp	NYVGTG--SA	TGGTAYSGAL	AINTPVGAAA	PALFGS-GGG	SVNGTDG <sup>N</sup> TS	AGSLGV <sup>Y</sup> YAF	237
Bjpp2	NYTPTG--SA	TGGTQ <sup>Y</sup> SGTL	GLN----AAG	TGLVGSNGSG	SVNGTDG <sup>N</sup> TS	AGALGV <sup>Y</sup> YAF	180
<b>BLpp</b>	IQFAGL <sup>T</sup> IGK	AOSQ <sup>T</sup> APWA	NYPANSE <sup>D</sup> GL	PGG-GGWE <sup>P</sup> V	TQFTY <sup>T</sup> ADFG	QGISAS <sup>F</sup> SAQ	219
Bjpp	IQFAG <sup>T</sup> TMGK	AVSQ <sup>F</sup> DAPWI	NYPGNNE <sup>D</sup> QL	VGGSG <sup>T</sup> TNGV	TQFTY <sup>T</sup> ADFG	QGVTA <sup>A</sup> FSAQ	239
Bjhp	IQFAG <sup>T</sup> TMGK	AVSQ <sup>F</sup> DAPWT	NYPGNNE <sup>D</sup> GL	VGGSG <sup>T</sup> VTGV	NQFSY <sup>T</sup> ADFG	QGITA <sup>A</sup> FSAE	297
Bjpp2	IQFAG <sup>T</sup> TMGK	AVSQ <sup>F</sup> DAPWT	NYPGNIT <sup>D</sup> NL	VGGSG <sup>T</sup> VTGV	TQFTY <sup>T</sup> ADFG	QGITA <sup>S</sup> FSAE	240
<b>BLpp</b>	DQVANYQ <sup>T</sup> NI	WNVSGATAAG	LATGAYGAND	FGGTRAPDLV	AML <sup>R</sup> VDQAWG	LFQASAA <sup>A</sup> AHD	279
Bjpp	DQTOVFQ <sup>T</sup> NI	WNTAGMSTTG	VLGGAYGSND	LGGTRAPDLV	GMV <sup>R</sup> VDQAWG	LFQASV <sup>A</sup> AHD	299
Bjhp	DATSY <sup>Y</sup> QAGN	VNLTGATAAG	IFGGAVGANA	IGGSRSPNLV	GMV <sup>R</sup> VDQAWG	LFQASV <sup>A</sup> AHD	357
Bjpp2	DATQY <sup>Y</sup> QAGN	LNMTGATAAG	MIGGSYGTNA	IGGSRSPNLV	GQV <sup>R</sup> VDQAWG	LFQASV <sup>A</sup> AHD	300
<b>BLpp</b>	NHANYYGADG	TTGHPCDKWG	WAGQAL <sup>S</sup> SIK	NIPTGAGDTI	NMSGVYTNGA	SRYNFQ <sup>S</sup> SYMS	339
Bjpp	NHVGYYGASE	VTGHPE <sup>D</sup> DKWG	WAVQAL <sup>L</sup> QIK	NIPTGAGDVI	NLSGVYT <sup>D</sup> GA	SRYNFQ <sup>E</sup> LAA	359
Bjhp	NHVGYYGPSE	VTGHPE <sup>D</sup> DKWG	WAVQAL <sup>S</sup> SIK	NIPTGAGDVI	NVSAVYT <sup>D</sup> GA	TRYNFQ <sup>N</sup> LAG	417
Bjpp2	NHVGYYGANE	TTGHPE <sup>D</sup> DKWG	WAVQAL <sup>S</sup> SIK	NIPTGAGDTI	NIQAVYT <sup>D</sup> GA	TRYNFQ <sup>N</sup> LSG	360
<b>BLpp</b>	STFAMYGGTS	APGAYQSVGL	AGLSDSVFVT	GAGQQLT <sup>T</sup> TY	GYQGGYTHNW	DPHWNSSVYG	399
Bjpp	TSYSMEGSS-	-NAAYQSIGF	AGVSDAVFGP	GGGLELT <sup>K</sup> TY	GFRGAYTHNW	SPYWNTALYG	417
Bjhp	STYVMYGSSG	LACAYGSVAA	VTAPDTVEFVT	GGQOETIKTW	GFRGAYTHNW	DPYWNTAIYG	477
Bjpp2	SSYALYCN <sup>S</sup> G	VAGAYGSIGF	ANAPDTVEFVT	GSSQETVK <sup>T</sup> W	GFRGAYTHNW	DAAWN <sup>T</sup> AIYG	420
<b>BLpp</b>	GLGAVRYNNT	AKGYICGAVV	ASLALS--TG	LAGCNP <sup>D</sup> FN	GVVGLVTRWT	PVKNL <sup>S</sup> FTAD	457
Bjpp	AWAAVNYSGT	AKGLICGSAA	FATLTG----	--TCNP <sup>D</sup> FN	GQVGVI <sup>T</sup> TRWT	PVKNL <sup>T</sup> FSAD	471
Bjhp	AYAQAQFGSG	AKTFLCGAG-	-GLLTVGQPG	LTGCNP <sup>D</sup> FN	GQVGII <sup>T</sup> TRWT	PVKNL <sup>T</sup> FSAD	535
Bjpp2	AYAQAQFGTL	AKTTL <sup>C</sup> GAGG	AGGVFGGLAG	VTSCNP <sup>D</sup> FAI	GQLGLVTRWT	PVKNL <sup>T</sup> FSAD	480
<b>BLpp</b>	LAYVMI <sup>D</sup> QKY	ASGSTVALPL	QASIAKPGTA	YELKDQ <sup>N</sup> ALT	LLRAQRNW	506	
Bjpp	FTYSHL <sup>D</sup> QKY	SG--VITTPA	LTGVAKPAAT	YELKDQ <sup>D</sup> TYS	LLRAQRNW	518	
Bjhp	LAWTNV <sup>D</sup> QKY	AG--TIAAGL	AAVPAKPAAT	YEVKDQ <sup>N</sup> SLV	LLRAQRNW	582	
Bjpp2	LSWTHL <sup>D</sup> QKY	SG--TVGVTP	NVVTAKPAAT	YELKDQ <sup>D</sup> SIA	MLRAQRNW	527	

Figura 42: Alineamiento múltiple de la secuencia deducida de BLpp, con las tres proteínas de mayor homología encontradas en las bases de datos, “posibles” porinas de *Bradyrhizobium japonicum* cepa USDA110. Los aminoácidos idénticos en todas las proteínas están sombreados en negro, los cambios conservativos en gris oscuro y los cambios semiconservativos en gris claro. **BLpp**: posible porina de *B. sp. (Lupinus)* de 506 aa (AY452712). **Bjpp**: “hypothetical protein” de *B. japonicum* de 518 aa (NP\_771623). **Bjhp**: “hypothetical protein” de *B. japonicum* de 582 aa (NP\_771716). **Bjpp2**: “putative porin” de *B. japonicum* de 527 aa (NP\_773528).

El análisis filogenético Neighbor-joining (Saitou y Nei, 1987) de diferentes porinas seleccionadas a partir del alineamiento múltiple Clustal W 1.82 del dominio conservado indicó la existencia de varios agrupamientos (fig. 43).

La proteína BLpp (AY452712) se agrupó en un nivel superior con las porinas de *Bradyrhizobium japonicum* y *Rhodopseudomonas palustris*, géneros próximos de rizobios, simbiontes facultativos, quedando más alejadas de otros géneros bacterianos como los patógenos animales del género *Brucella* o *Bordetella*.

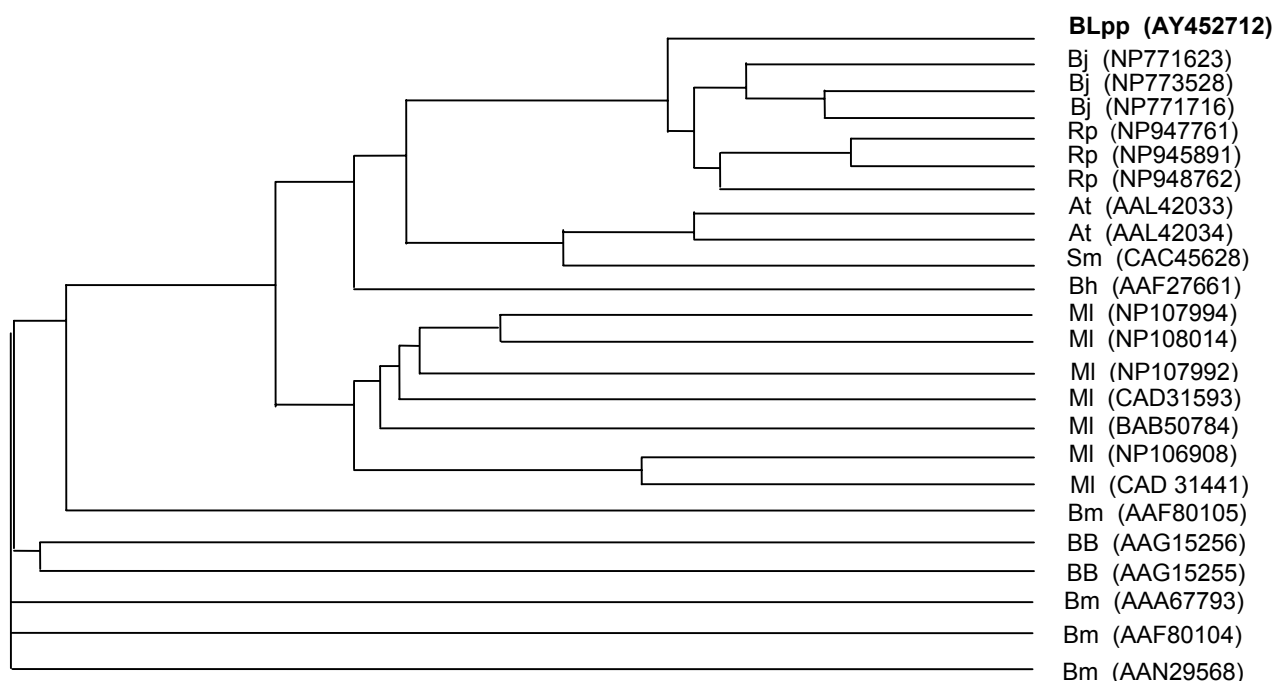


Figura 43: Análisis filogenético Neighbor-joining (Saitou y Nei, 1987) de un dominio conservado típico de porinas en diferentes géneros bacterianos seleccionados a partir del alineamiento múltiple Clustal W 1.82.: At: *Agrobacterium tumefaciens*; BB: *Brucella* sp. B14/94; Bh: *Bartonella henselae*; Bj: *Bradyrhizobium japonicum*; Bm: *Brucella melitensis*; MI: *Mesorhizobium loti*; Rl: *Rhizobium leguminosarum*; Rp: *Rhodopseudomonas palustris*; Sm: *Synorhizobium meliloti*. El número de acceso se indica a continuación de la proteína.

#### 8.4. Predicción del modelo estructural de BLpp

La predicción estructural de los dominios reconocidos en la proteína BLpp, se realizó mediante programas informáticos (3D-PSSM y Libellula). En la secuencia, a nivel estructural, se han identificado un motivo de asociación a membrana, próximo al extremo C y otro característico de la subfamilia de las porinas, situado a 30 aa “*upstream*” de la región N-t (30-117 aa; fig. 44).

De entre los motivos frecuentes en la secuencia proteica BLpp, cabe destacarse la identificación de un posible sitio de unión a lipoproteínas de membrana de procariotas (Prosite, código PS00013), cuya secuencia consenso es {DERK} (6)-[LIVMFIRSTAG] (2)-[LIVMFIRSTAGCQ]-[AGS]-C (C es el sitio de unión a lípidos), situado en la región 421-431, como se muestra en la figura 44.

BLpp\_ MKLTRSVLLGSAAMFAAAGAQAADLPVKAKAIEYVKICSLYGAGFYIIPGTDTCIKLGGYLRASLGL

BLpp\_ . . . . .GTN.GIYSTPDSSTVAARNRLSNYYTAQSRVDL. . . .SVDTRTATEYGVVPTYWE.GVNTWT

BLpp\_ TGGYTGTGTTA.VNGATSYTTS. . .IASQVSAG. . . . .SLGV. . . .YYAFIQFAGLTIGKAQSQF

BLpp\_ T. .APWANYPANSFDGLPGGCGWEPVTQFTYTADFQGISASFSAQDQVANYQTNINNVSGATAAGL

BLpp\_ ATGAYGANDFGGTRAPDLVAMLRVDQ. .AWG. . . . .LFQASAAAH. . . . .DNHANYYGADGTTG.

BLpp\_ . . . . . .HPGDKWGWAGQLALSINKNIPTGAGDTINMSGVYTNGASRYNFQSYMSSTFAMYGGTSAP

BLpp\_ GAYQSVGLAGLSDSVFVTGACQQLTTTYGYQGGYTHNWDPHWNSSVYGGLGAVRYNNNTAKGYICGAV

BLpp\_ VASLALSTGLAGCNPDFNYGVVGLVTRWTPVKNLSTADLAYVMLDQKYASGSTVALPLQASIAKPG

BLpp\_ TAYELKDQNALTLLRAQRNW

Figura 44: Posibles dominios funcionales y sitios de modificación post-traduccionales de la proteína BLpp. Los sitios de N-glicosidación se señalan con un sombreado en rojo, el sitio de Glicosaminoglucano en rosa, los sitios de fosforilación proteína Kinasa C en azul, los sitios de fosforilación caseína Kinasa II en verde claro, los sitios de N-miristoilación en violeta y el motivo de unión a membrana (Prokaryotic membrane lipoprotein lipid attachment site) en amarillo. La línea superior naranja señala la posición del dominio típico de porinas desde el aminoácido 30 al 117.

Además en este análisis de la proteína fueron identificados una serie de posibles sitios de modificación post-traduccionales. Los sitios de N-glicosilación específicos en las secuencias consenso N-Xaa-S/T se situarían en los residuos aminoacídicos (231-234, 320-323, 394-398, 407-410, 451-454). Además se identificaron: un sitio de glicosaminoglucano (prosite, código PS00002), cuyo patrón consenso es S-G-x-G (siendo S el sitio de unión), entre las posiciones 78 a 81, dos sitios de fosforilación de proteína Kinasa C (PKC, PS00005), cuyo consenso es [ST]-x-[RK] (siendo la S ó T el sitio de fosforilación), en los residuos de la secuencia: 307-309 y 409-411; seis sitios de fosforilación de proteína caseína Kinasa II (CKII, código PS00006), con el patrón [ST]-x(2)-[DE] (siendo la S ó T, el sitio de fosforilación) en los residuos de la secuencia: 74-77, 95-98, 105-109, 114-117, 217-220, 486-489, y veintitrés sitios de N-miristoilación (Prosite, código PS00008), cuya secuencia consenso es G-{EDRKHPFYW}-x(2)-[STAGCN]-{P} (G es el sitio de N-miristoilación), en los residuos: 19-24, 50-55, 66-71, 79-84, 110-115, 125-130, 155-160, 165-170, 189-194, 209-214, 234-239, 243-248, 269-274, 286-291, 314-319, 323-328, 352-357, 361-365, 372-377, 399-404, 416-421, 427-432, 470-475. No obstante en las modificaciones post-traduccionales no es suficiente con la presencia de la secuencia consenso para concluir que un residuo determinado es glicosilación, fosforilación o miristoilación debido al hecho de que el dominio de la proteína juega un papel importante en la regulación de estos sitios post-traduccionales.

La falta de identidad ( $\leq 30\%$ ) significativa con secuencias de otras proteínas de estructura tridimensional resuelta experimentalmente, ha impedido llegar a construir con fidelidad la aproximación a un modelo en 3 dimensiones de la conformación de la proteína, incluyendo a su hipotético dominio transmembrana.

No obstante según la clasificación SCOP, aplicada al correspondiente modelo de estructura de la secuencia, es interesante la identificación de un hipotético dominio transmembrana  $\beta$ -barrel correspondiente a la cadena P de porina específica de sacarosa (*Sucrose-specific porin*, PDB código 1A0T), presente en proteínas de membrana externa de enterobacterias y perteneciente a la superfamilia de las porinas.

La predicción de este hipotético dominio de estructura secundaria de BLpp, esta basada en la asunción de que el dominio de la proteína en principio corresponde a la estructura de 1A0T resuelta experimentalmente (Forst *et al.*, 1998). La estructura secundaria del dominio sería  $\alpha$ -hélice en la iniciación del péptido señal de BLpp y en la región anterior al motivo de unión a membrana, no obstante la estructura secundaria sería esencialmente lámina- $\beta$  (fig. 45).

## Resultados

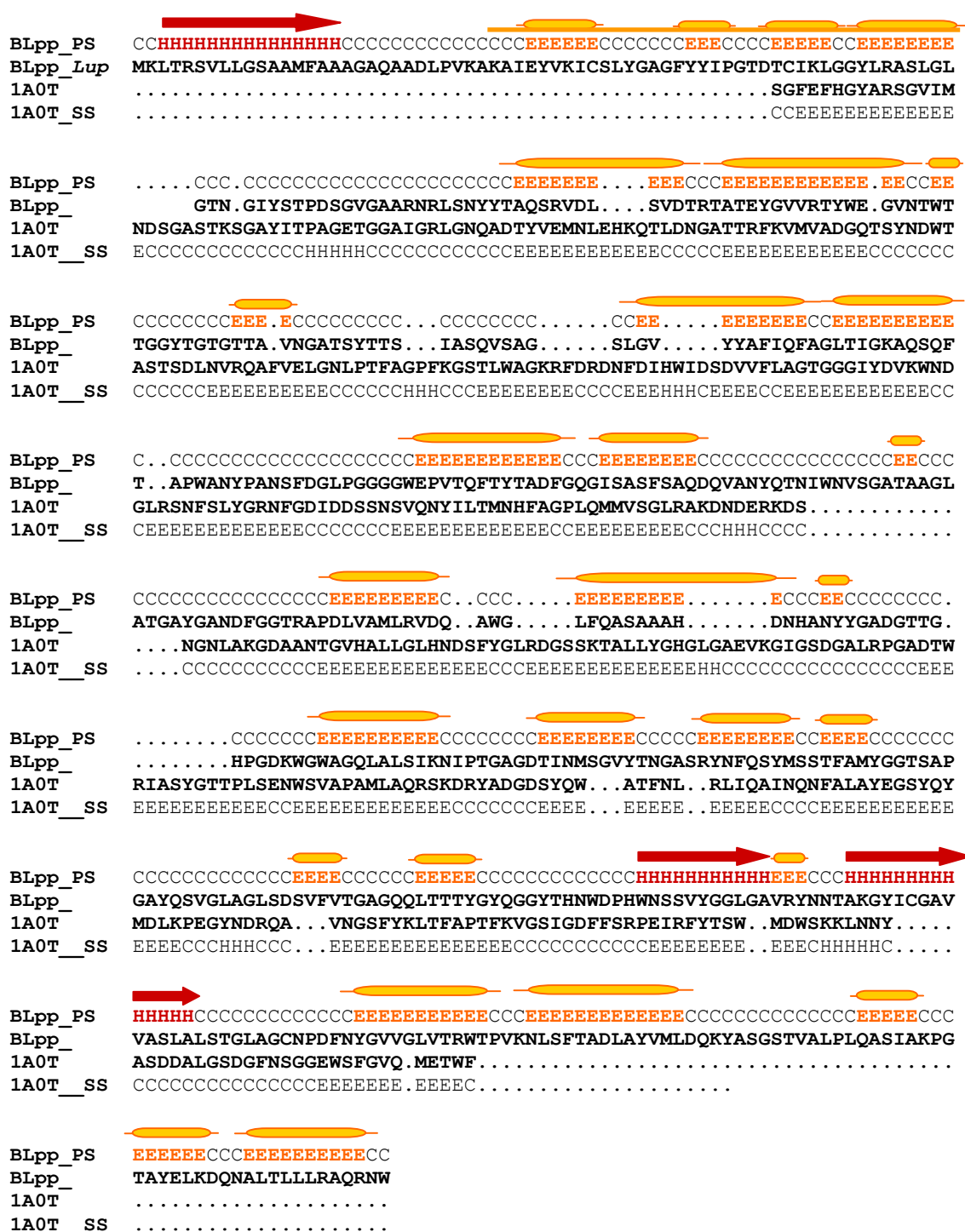


Figura 45: Predicción de la estructura secundaria de la proteína BLpp y de 1A0T. Encima de la secuencia se indica la estructura en  $\alpha$ -hélice (**H**, una flecha roja), la estructura en lámina- $\beta$ , (**E**, un cilindro naranja) y las regiones en lazo “loop” (**C**), en los espacios libres. **BLpp\_PS**: predicción de la estructura secundaria de BLpp. **BLp**: estructura primaria de BLpp. **1A0T**: estructura primaria de “chain P Sucrose-specific porin”. **1A0T\_SS**: estructura secundaria de “chain P Sucrose-specific porin”.

### 8.5. Análisis genómico por *Southern blot*

La organización en el genoma de *B. sp. (Lupinus)* cepa ISLU16 se llevó a cabo mediante un ensayo de *Southern blot genómico*.

El ADN genómico fue digerido con tres enzimas de restricción *BamH* I, *EcoR* I y *Hind* III e hibridado con la sonda homóloga *blpp* (apartado 2.22. de Materiales y Métodos), en condiciones de hibridación muy restrictivas, para impedir hibridaciones con otras secuencias homólogas.

En cada una de las digestiones, como se muestra en la figura 46, se observa una única señal de hibridación de igual intensidad, lo que nos indica que la sonda de *blpp* hibridó en todos los casos con un único fragmento del genoma bacteriano. En el DNA digerido con la enzima *BamH* I fue visualizada la señal de hibridación en una banda de 6.108 pb aproximadamente, con la enzima *EcoR* I en una banda de 22.740 pb y con *Hind* III en una banda de 21.226 pb.

Estos ensayos de hibridación son indicativos de que la proteína BLpp está codificada por un único gen en el genoma bacteriano.

### 8.6. Análisis de la expresión del gen *blpp*

Con objeto de comprobar si la inducción del polipéptido BLpp a altas concentraciones de glifosato, 5 y 10 mM, es debido a una inducción transcripcional ó a ensayos post transcripcional, se llevó a cabo el análisis de su expresión mediante *Northern blot*. Los ensayos fueron realizados en nódulos de *Lupinus albus* y en la bacteria *B. sp. (Lupinus)* ISLU16 en vida libre, ambos tratados con glifosato. El ARN total del nódulo y el ARN bacteriano de la cepa ISLU16, expuestos a concentraciones crecientes de herbicida, fueron transferidos e hibridados con la sonda en condiciones muy restrictivas como se describe en el apartado 2.23. de Materiales y Métodos. Las diferentes concentraciones de glifosato probadas con el nódulo (1,25, 2,5 y 5 mM) y con la bacteria (31,25 y 62,5  $\mu$ M), fueron escogidas según los resultado de los ensayos de sensibilidad realizados con dicho herbicida.

En las figuras 47 y 48 se muestran los resultados de los análisis por *Northern blot* de la acumulación del ARN que codifica la proteína BLpp. En el nódulo los niveles de acumulación de ARN experimentan un incremento conforme aumenta la concentración del herbicida, alcanzando los niveles máximos a 5 mM, lo que indicaría una expresión constitutiva basal en el ARN de los nódulos de las plantas control que se incrementa en los tratamientos con dosis de herbicida 5 y 10 mM (fig. 47).

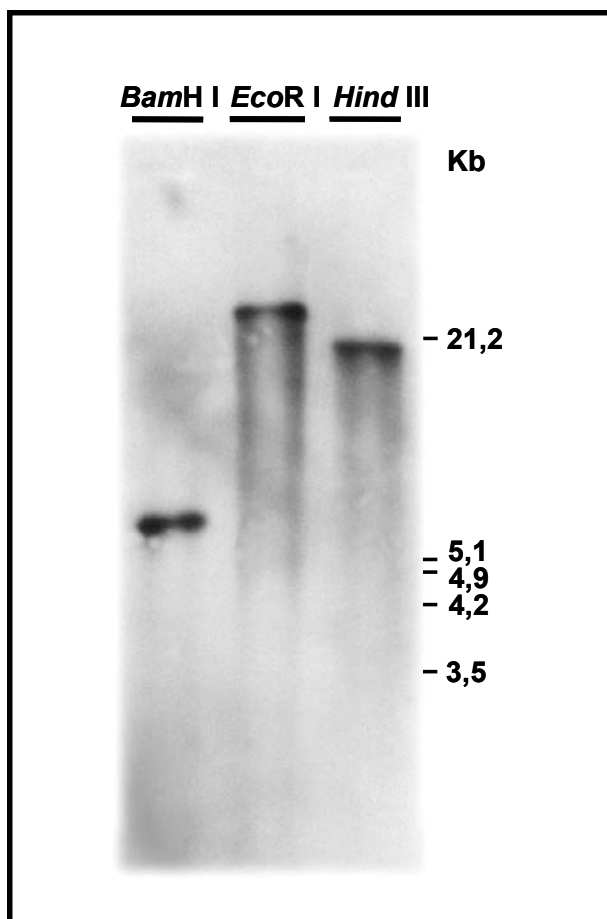


Figura 46: Análisis Southern blot de *Bradyrhizobium* sp. (*Lupinus*) ISLU16. El ADN genómico fue digerido con enzimas de restricción (*BamH* I, *EcoR* I y *Hind* III) y detectado con una sonda homóloga de ARN marcada con digoxigenina, derivada del plásmido que contiene 632 pb del gen *blpp*. A la derecha se indican las masas moleculares del marcador  $\lambda$  cortado con *EcoR* I y *Hind* III.

La cuantificación de los niveles relativos de los transcritos en el nódulo reveló que existe un aumento de la expresión en 2,5 mM que llega a ser máximo en los tratamientos de 5 y 10 mM, indicando una activación transcripcional del gen (fig. 47). Estos resultados concuerdan con el incremento en los niveles de proteína detectados en el patrón electroforético del citosol bacteroidal (fig. 23). Asimismo revelan diferencias en su patrón de expresión de la bacteria en vida libre y en simbiosis.

En la bacteria se detectó sólo acumulación del ARN, cuando fue crecida en ausencia de glifosato (fig. 48).

En ambos casos, el tamaño del RNA correspondiente a la proteína BLpp es aproximadamente de 1,5 Kb estimado sobre la movilidad electroforética de CMV y este tamaño corresponde con el estimado para el ARN del gen *blpp*.



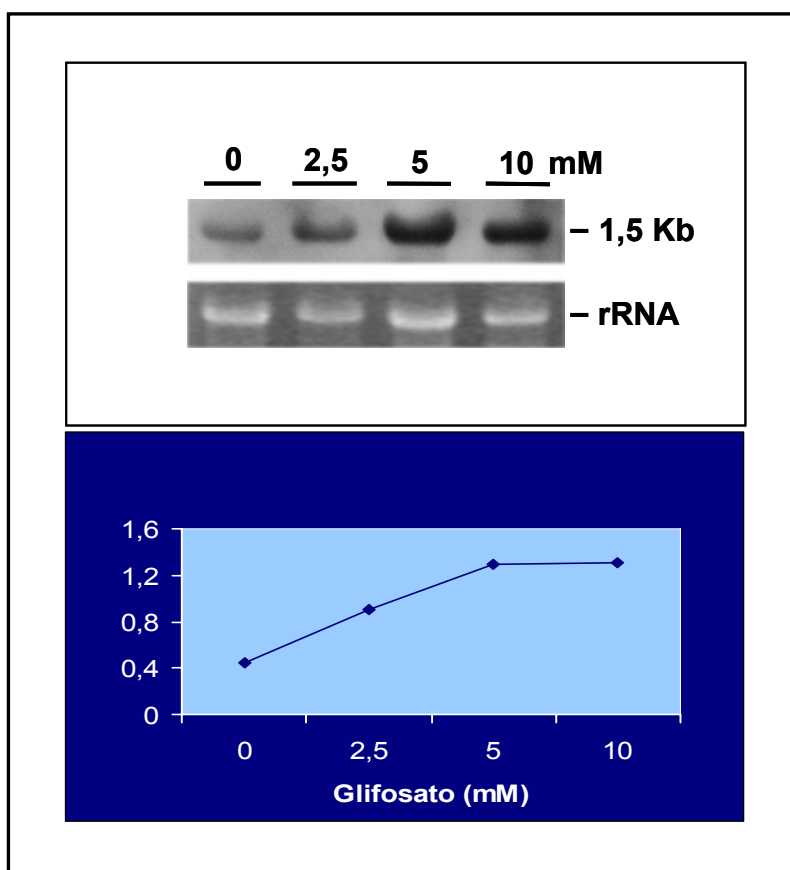


Figura 47: Análisis de la expresión del gen que codifica para BLpp en nódulos de *Lupinus albus* tratados con diferentes concentraciones de glifosato (mM). El ARN total, fue separado mediante electroforesis, transferido a membrana de nylon e hibridado con una sonda homóloga marcada con digoxigenina. En el panel inferior se muestra la cuantificación del Northern blot, donde se muestran los niveles relativos de los transcritos en cada concentración de tratamiento.

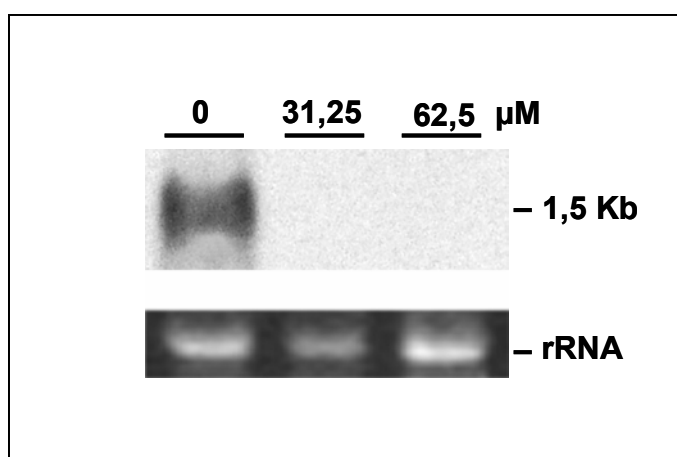


Figura 48: Análisis de la expresión del RNA de *Bradyrhizobium* sp. (*Lupinus*) ISLU16 crecidas en vida libre con diferentes concentraciones de glifosato. El ARN (5  $\mu$ g) fue transferido e hibridado con una sonda de ARN homóloga marcada con digoxigenina. En el panel inferior se muestra la visualización del gel con BrEt.

### 8.7. Localización de los transcritos de *blpp*

Para la localización celular de los transcritos de *blpp* en el bacteroide, secciones de nódulos incluidas en LR-White se hibridaron con la sonda marcada con digoxigenina y se observaron por microscopía electrónica de transmisión. Las partículas de oro hibridadas fueron escasas, localizándose los transcritos en la zona de la pared celular y la membrana de la bacteria (fig. 49A). Asimismo se encontró poca señal de hibridación en la zona del núcleo y del nucleolo (fig. 49B).

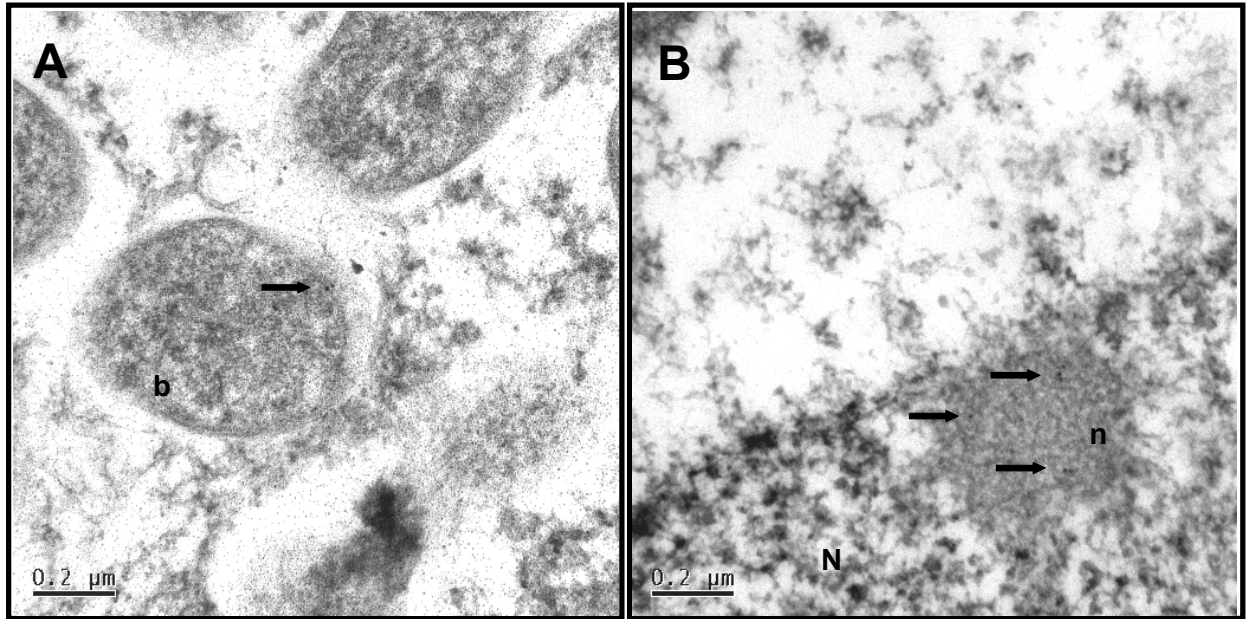


Figura 49: Localización *in situ* de transcritos de *blpp* en nódulo tratado con glifosato 10 mM después de 5 días. A) Detalle de una bacteria en la zona infectada nodular. B) Detalle del núcleo y nucleolo de la célula infectada. Las puntas de flecha indican la acumulación de transcritos. b: bacteria; N: Núcleo; n: nucleolo.

*DISCUSIÓN*







El efecto de diferentes herbicidas, inhibidores del transporte de electrones (cianacina, linuron, simazina, etc.) sobre la simbiosis *Lupinus albus-Bradyrhizobium*, ha sido estudiado en nuestro laboratorio, tanto sobre el microsimbionte como en el macrosimbionte. El modo de acción de los herbicidas ensayados anteriormente incide sobre el aparato fotosintético. Sin embargo, esta es la primera vez que estudiamos la simbiosis bajo el efecto de un herbicida, el glifosato, que inhibe la síntesis de aminoácidos aromáticos en plantas, bacterias y hongos. Este hecho hace que el glifosato cuyo modo de acción es igualmente adverso sobre la planta y sobre el *Rhizobium*, afecte severamente a la simbiosis y al metabolismo nodular como discutiremos más adelante, a pesar de ser uno de los herbicidas más recomendados para el control de las malas hierbas por su rápida degradación.

Los nódulos de las leguminosas son órganos optimizados para el funcionamiento del simbiosoma, orgánulo especializado en la fijación de nitrógeno, proceso que depende del hospedador, del microsimbionte y de las condiciones del medio. En este sentido la fijación biológica de nitrógeno es comúnmente descrita como un proceso muy sensible a numerosos estreses abióticos, a los que habitualmente se pueden ver expuestas las plantas, entre los que se incluyen estrés hídrico (Verdoy *et al.*, 2004), oxidativo (Hernández-Jiménez *et al.*, 2002), salino (Fernández-Pascual *et al.*, 1996; Verdoy *et al.*, 2004), así como variaciones de las presiones de oxígeno (Guasch *et al.*, 2001), presencia de metales pesados (Carpena *et al.*, 2003; Pastor *et al.*, 2003), nitrato (de Lorenzo *et al.*, 1993) y herbicidas (de Felipe *et al.*, 1987; Fernández-Pascual *et al.*, 1988, 1992, 1996, Hernández *et al.*, 1999; Royuela *et al.*, 2000). Los resultados son diferentes en cuanto a la resistencia o susceptibilidad a estreses abióticos de plantas noduladas o fertilizadas con nitrato. En este sentido, estudios con diversas leguminosas noduladas, ponen de manifiesto que la planta es más tolerante en simbiosis a ciertos herbicidas que las plantas dependientes de nitrato (González *et al.*, 1996; Royuela *et al.*, 1998). Sin embargo, en plantas de soja se observa un efecto muy similar frente al herbicida en plantas regadas con nitrato que en plantas noduladas (Hernández, 1999). Estas diferencias dependen de la capacidad genética de la planta en términos de reducción de nitrato y extensivamente dependen de los efectos adversos de los herbicidas, no sólo sobre la fijación de nitrógeno sino también sobre el transporte y la reducción del nitrato en cada genotipo en particular.

## 1. Sintomatología y parámetros de crecimiento

En nuestro estudio, el efecto del glifosato en la planta se traduce en primer lugar en una manifestación de alteraciones en la sintomatología de las hojas. Cabe destacar la clorosis en hojas de nueva formación y no en hojas maduras cuando el tiempo de

tratamiento es de 12 días. El síntoma de clorosis en hojas jóvenes ha sido descrito en plantas de soja tratadas con glifosato (Hernández, 1996). Este autor atribuye el efecto del glifosato a una inhibición de la síntesis de proteínas implicadas en la biosíntesis de clorofilas y no en su biodegradación. La mayor sensibilidad de las hojas jóvenes al herbicida puede deberse a que éstas actúan como sumideros energéticos, acumulando gran cantidad de glifosato que es translocado junto con los azúcares vía floema (Duke, 1988). Otro síntoma destacable de estrés por el glifosato en *Lupinus albus*, es la aparente pérdida de turgencia de las hojas. Esta podría ser debida a una inhibición del transporte apoplástico o/y simplástico en la hoja, en la que se produciría una contracción del contenido celular por pérdida de agua, el citoplasma se separaría de la pared celular como en procesos de plasmólisis, con lo que el transporte simplástico celular se encontraría alterado, con la consiguiente pérdida del gradiente de presiones existente a lo largo de la raíz y hasta la parte aérea. Si bien en nuestros experimentos no hemos determinado el estado hídrico de la planta, el parámetro de las hojas nos proporciona información indirecta sobre dicho estado. En nuestros resultados la relación PF/PS es correlativa con el descenso hídrico, ya que disminuye significativamente, a partir de los 5 días de tratamiento. Como consecuencia de la pérdida hídrica los estomas se cierran, según hemos observado en cortes de hojas por microscopía óptica (datos no mostrados), impidiéndose la transpiración. En este sentido algunos autores han constatado un descenso en la conductancia estomática en leguminosas (Muñoz-Rueda *et al.*, 1986; Shaner y Lyon, 1979) y remolacha (Madsen *et al.*, 1995). En particular, en plantas de soja, el glifosato disminuye la tasa de asimilación de CO<sub>2</sub> y aumenta la concentración interna de CO<sub>2</sub> causando el cierre estomático, el cual determina una menor transpiración (Hernández, 1996). En nuestros resultados la inhibición del transporte impediría el transvase de los productos fotosintéticos a la raíz y al nódulo, y la consiguiente inhibición de los procesos celulares en el interior nodular, como la inhibición de la fijación de nitrógeno.

Por otra parte, estas alteraciones acusadas a las 24 horas del tratamiento, ponen de manifiesto la rápida translocación del glifosato desde la parte aérea, donde es aplicado, hasta los órganos de mayor actividad metabólica, nódulos y hojas de nueva formación.

Los parámetros de crecimiento de la leguminosa en condiciones simbióticas con glifosato son afectados a partir de los 5 días, sin mostrar apenas modificaciones previamente. Estos datos ponen de manifiesto el grado de resistencia de la planta *Lupinus albus* cuando es sometida a condiciones de estrés ambiental. Esta observación ha sido anteriormente apoyada por algunos autores en estudios con plantas noduladas de *Lupinus albus* crecidas bajo condiciones desfavorables (Carpena *et al.*, 2003; de



Lorenzo *et al.*, 1993; Fernandez-Pascual *et al.*, 1996; Guasch *et al.*, 2001; Pastor *et al.*, 2003), demostrando incluso su capacidad para acumular metales pesados en las raíces (Carpena *et al.*, 2001; Zornoza *et al.*, 2002) y su potencial fitorremediador en agrosistemas degradados (Pastor *et al.*, 2003).

Sin embargo, el glifosato redujo sensiblemente el peso de hojas, raíces y nódulos en concentraciones altas y en tiempos de exposición largos. La disminución en el peso nodular sería debida a un efecto sobre el desarrollo de estos nódulos a lo largo del estudio y no a una reducción en el número de los mismos, ya que el herbicida se aplica en la planta adulta a las 5 semanas de la siembra, por lo que los nódulos ya están formados. La disminución del peso seco de nódulos por planta ha sido también observada mediante la aplicación de terbutrina en plantas de lentejas (Sandhu *et al.*, 1991) y en plantas de guisante bajo el efecto de diferentes herbicidas (Singh y Wright, 1999; Royuela *et al.*, 2000). La inhibición del crecimiento de las estructuras vegetales del nódulo y de los propios bacteroides podría ser la causa del menor crecimiento nodular en las plantas tratadas. Esta inhibición podría estar causada por la pérdida de regulación de la ruta del ácido shikímico, produciendo una limitación de esqueletos carbonados, así como la inhibición de la síntesis de proteínas (Jensen, 1985) y la acumulación de metabolitos fenólicos potencialmente tóxicos (Lyndon y Duke, 1988; Becerril *et al.*, 1989).

Estudios previos en nuestro laboratorio en los que ha sido descrita la inhibición del crecimiento de leguminosas bajo el efecto de diferentes herbicidas, establecen que los efectos adversos producidos por los herbicidas son complejos y controvertidos, dependiendo del tipo de herbicida, así como de la especie de la planta y de la dosis de tratamiento (de Felipe *et al.*, 1987; Fernández-Pascual *et al.*, 1988, 1992, 1996). Asimismo, con la aplicación del herbicida imazetapir, en plantas de guisante, González *et al.*, 1996, encontraron inhibido el crecimiento de la planta con concentraciones superiores a 1,73  $\mu\text{M}$ . Estos autores achacan la inhibición del crecimiento a efectos adversos del herbicida sobre el proceso de infección. Sin embargo, estos efectos adversos sobre la iniciación de la nodulación, en mayor medida que sobre el desarrollo nodular, fueron atribuidos al efecto sobre la planta, más que a un efecto directo sobre la bacteria. Posteriormente, Royuela *et al.*, 2000, observaron que el imazetapir no tiene un gran efecto sobre el desarrollo del nódulo de guisante pero sí sobre la iniciación de la nodulación y el desarrollo de la planta, ya que a los 28 días con 0,7  $\text{mg L}^{-1}$  se produce un descenso del 80% en el peso de las raíces, se reduce el número de nódulos y su biomasa, aunque los nódulos son 4 veces más grandes. Estos autores sugieren que la reducción del crecimiento de la planta y la consiguiente bajada de la actividad nitrogenasa es debida a la falta de carbono en los sumideros metabólicos, como consecuencia de la inhibición de la enzima acetolactato sintasa. También se ha atribuido

principalmente a los cambios en la captación de oxígeno y a la inducción de procesos de fermentación que generan productos finales tóxicos implicados en la limitación de carbohidratos (Gaston *et al.*, 2002). Asimismo, han sido descritos efectos adversos con los herbicidas carboxina, pendimetalina y trifluralina sobre la nodulación y la fijación de nitrógeno en soja (Mallik y Tesfai, 1985; Bollich *et al.*, 1988), así como con clorsulfuron en plantas de alfalfa y trébol, relacionando la disminución en el peso de la planta con la bajada de la actividad nitrogenasa (Martensson, 1989). Sin embargo Sprout *et al.*, 1992, relacionan el efecto del herbicida metribucina sobre los parámetros de crecimiento en plantas de lentejas con el tiempo de aplicación y la disminución en el aporte de fotosintetizados a la raíz.

En la mayoría de los estudios descritos existe una correlación entre la disminución en los parámetros de crecimiento de la leguminosa y la fijación de nitrógeno, aunque los estudios llevados a cabo por Singh y Wright, 1999 y Clark y Mahanty, 1991 no muestran afectada la fijación de nitrógeno.

## 2. Efecto del herbicida sobre la fijación de nitrógeno

La fijación de nitrógeno se inhibe cuando las plantas de *Lupinus albus* en simbiosis con *Bradyrhizobium* sp. (*Lupinus*) se exponen a condiciones ambientales adversas, sin embargo, el mecanismo de esta inhibición no se conoce aún con exactitud. No obstante, se ha constatado que la respuesta de la planta *Lupinus* a los herbicidas, desde la perspectiva de la fijación de nitrógeno, tiene patrones comunes con el resto de estreses abióticos. Además este efecto inhibitorio sobre la actividad nitrogenasa provocado por diferentes herbicidas ha sido descrito también en otras leguminosas (Mallik y Tesfai, 1985; Cardina *et al.*, 1986; Bollich *et al.*, 1988; Martensson y Nilsson, 1989; Martensson, 1992; Sprout *et al.*, 1992; González *et al.*, 1996; Singh y Wright, 1999; Royuela *et al.*, 2000).

En nuestros resultados, el efecto del glifosato sobre la actividad nitrogenasa, medido por ARA, mostró una bajada drástica de la actividad del 33%, desde la menor concentración ensayada (1,25 mM) con tan sólo 1 día de exposición, e incluso alcanzó su inhibición total a los 3 días con la concentración 10 mM. Este descenso en la actividad fijadora del sistema simbiótico con glifosato, no se corresponde con la bajada del resto de los parámetros de crecimiento cuyo efecto no es patente hasta los 5 días de tratamiento. Entre las posibles causas que justificarían esta disminución tan espectacular, se postularon las siguientes hipótesis: por un lado podría ser debido a que el glifosato tuviera un efecto directo sobre la propia enzima nitrogenasa o bien que dicha bajada fuera debida a un efecto indirecto sobre el macrosimbionte mediante la reducción en el

aporte de fotosintetizados al nódulo, o a una inhibición de los procesos que tienen lugar en el citosol celular del nódulo, como trataremos a continuación.

La primera hipótesis en la que el glifosato afectaría directamente sobre la enzima en su destrucción, es descartada considerando los resultados de la inmunodetección de la nitrogenasa. En ésta, tanto el componente I o proteína MoFe, como el componente II o proteína Fe, no mostraron variaciones con la concentración inferior ensayada 1,25 mM incluso a los 4 días de tratamiento. Sin embargo, con esta misma concentración a las 24 horas ya se había puesto de manifiesto la bajada drástica de la actividad enzimática. La destrucción de la nitrogenasa se detectó a partir de 4 días de tratamiento a concentraciones altas de glifosato y principalmente sobre el componente II, por lo que la inhibición fue causada más por la regulación fisiológica que por la destrucción enzimática, poniendo de manifiesto que el sistema nitrogenasa es altamente sensible al herbicida, lo suficiente para inhibir su actividad, aunque manteniendo todos los epítomos reconocidos por los anticuerpos.

La falta de relación entre la actividad nitrogenasa y la detección de sus componentes enzimáticos ha sido también descrita en bacteroides procedentes de nódulos no efectivos de guisante y en nódulos de lupino bajo diferentes presiones de oxígeno (Suganuma *et al.*, 1998; Guasch *et al.*, 2001).

Por otro lado, como hemos visto, estudios previos demostraron que la barrera de resistencia a la difusión de oxígeno de la corteza nodular, regula el intercambio gaseoso, adaptándose ante situaciones de estrés para la planta (de Lorenzo *et al.*, 1993; Fernández-Pascual *et al.*, 1996; Guasch *et al.*, 2001; Carpena *et al.*, 2003; Verdoy *et al.*, 2004). Ante tales ambientes adversos se reduce la disponibilidad de oxígeno para la respiración bacteroidal, la capacidad de generar ATP y con ello la fijación enzimática de nitrógeno. Entre los mecanismos que contribuyen a la regulación del funcionamiento de dicha barrera se encuentran las glicoproteínas reconocidas por los anticuerpos MAC 236 y MAC 265, en el cortex nodular. Nuestros resultados sugieren que el glifosato, translocado desde las hojas al nódulo, produce la disminución de las glicoproteínas reconocidas por los anticuerpos MAC 236 y MAC 265, como hemos observado en la inmunodetección mediante *Western blot*. La oclusión de los espacios intercelulares en la zona 2 del cortex nodular causada por la glicoproteína, descrita en diferentes estreses (de Lorenzo *et al.*, 1993; Verdoy *et al.*, 2004; Carpena *et al.*, 2003), no se corresponde con las alteraciones por el herbicida glifosato, puesto que el glifosato causa la disminución del contenido de glicoproteína con respecto al control contrariamente a lo observado en otras situaciones adversas. Además el descenso detectado en el *Western blot* mediante los anticuerpos MAC 236 y MAC 265, está en correlación con la apertura de los espacios intercelulares observada por microscopía óptica a altas concentraciones

en la corteza nodular (zona 2), lo que significa que no hay inhibición de la difusión de oxígeno por parte de la barrera, a través de los nódulos hasta después de 5 días bajo la concentración de 10 mM. Es interesante destacar que la barrera de resistencia a la difusión de oxígeno no se ajusta cuando el nódulo es sometido al herbicida glifosato, inversamente a lo que ocurre en tratamientos de la planta con nitrato, oscuridad, sequía, inundación y bajas concentraciones de oxígeno.

### **3. Cambios en la ultraestructura del nódulo y de la hoja en plantas de *Lupinus albus* tratadas con glifosato**

Los efectos del glifosato sobre la ultraestructura nodular dependen de la concentración aplicada y del tiempo de exposición al herbicida. A partir de 2,5 mM los efectos del glifosato fueron severos en la ultraestructura de la zona infectada del nódulo. A los 5 días de aplicación las alteraciones fueron semejantes a las descritas por Hernández-Jiménez *et al.*, 2002 en senescencia. Los cambios observados pusieron de manifiesto una degradación progresiva en el citosol bacteroidal de elevada densidad a los electrones, con la ruptura de la membrana bacteroidal en algunas ocasiones y la permanencia de la membrana peribacteroidal del simbiosoma en otros casos. Esta degradación del bacteroide por el herbicida, conservando la membrana peribacteroidal ya había sido descrita por Hernández-Jiménez *et al.*, 2002 bajo senescencia natural e inducida por oscuridad, así como en tratamientos de nitrógeno combinado (de Lorenzo *et al.*, 1990) y con la aplicación de otros herbicidas (Fernández-Pascual *et al.*, 1988). Aunque no se corresponde con el patrón observado en tratamientos de bajas presiones de oxígeno en nódulos de lupino (Guasch, 1998). La degeneración celular observada fue función de la concentración del glifosato y del tiempo de aplicación, si bien la coexistencia de células infectadas diferencialmente afectadas en su estructura por el herbicida fue patente hasta en la mayor concentración aplicada, lo que indica además del efecto gradual, un efecto diferencial del glifosato sobre la estructura celular del nódulo. Cuando aplicamos la concentración más alta, 10 mM parece haber una gran actividad lítica en los simbiosomas con desintegración del contenido celular, a pesar de que junto a estas células se presentan otras células infectadas aparentemente intactas.

La ausencia de la membrana peribacteroidal del simbiosoma, observada en ocasiones, puede afectar en mucho la eficiencia y funcionamiento nodular, debido a que el transporte de solutos entre el citosol y el bacteroide tiene lugar a través de la membrana peribacteroidal y de esta forma la entrada y salida a través de los transportadores localizados en la membrana peribacteroidal estaría inhibida. Por consiguiente, la pérdida de la membrana peribacteroidal desprotege al bacteroide, su función como barrera física entre el bacteroide y la célula infectada ya no existe. La

exposición directa del bacteroide al citosol nodular podría provocar una respuesta defensiva por parte de la célula hospedadora sobre el microsimbionte. Por otra parte, la función en el intercambio de sustancias y señales entre los dos simbioses también se encontrará suspendida, limitando el transporte de carbohidratos aportados por la planta y el nitrógeno fijado por el bacteroide en forma de amonio. Además, el nódulo de *Lupinus* en la zona infectada únicamente tiene células infectadas, no tiene células intersticiales como ocurre en la soja en donde hay vacuolas que mantienen la turgencia en la célula, es por esto por lo que la integridad de las membranas del bacteroide juegan un papel muy importante en el mantenimiento de la turgencia de la célula infectada. La ruptura o desintegración de la membrana provocaría una alteración de la presión osmótica e inhibición del transporte del bacteroide limitando la disponibilidad de solutos a aquellas células que mantienen intacta las estructuras de membrana.

En los nódulos de lupino tratados con simazina las células sufren una reducción de su tamaño y alteraciones en la forma (de Felipe *et al.*, 1987). También en nuestros resultados a los 7 días hemos observado una disminución en el tamaño de las células infectadas, así como una pérdida de la forma y del interior del entramado bacteroidal. Otros herbicidas como el Lindex producen un aumento del número de bacteroides con gran cantidad de filamentos de ADN y de reservas de polifosfato y poli- $\beta$ -hidroxibutirato, a pesar de que la actividad nitrogenasa desciende (de Felipe *et al.*, 1987).

Similares alteraciones en las células infectadas del nódulo tratado con glifosato, pueden observarse no sólo en procesos de senescencia (Hernández-Jiménez *et al.*, 2002) o en tratamientos con herbicidas (Fernández-Pascual *et al.*, 1988; de Felipe *et al.*, 1987), sino también en nódulos sometidos a otros factores abióticos, como puede ser la toxicidad por metales pesados (Carpena *et al.*, 2003).

A pesar de la importancia del glifosato en agricultura como herbicida, no existen muchos estudios sobre las alteraciones producidas en la ultraestructura celular, y los existentes sólo se centran en el efecto observado sobre los tejidos fotosintéticos. Los tejidos celulares no son claramente el sitio inicial de acción del glifosato y cualquier efecto ultraestructural observado se aleja espacial y temporalmente del sitio de acción. Sin embargo, las alteraciones descritas han evidenciado un efecto indirecto muy drástico sobre la ultraestructura nodular. Además, cuando comparamos los cambios ultraestructurales debidos al herbicida sobre el aparato fotosintético, los resultados observados son muy similares a los descritos en tratamientos con otros herbicidas que sí tienen su blanco de acción sobre éste. Por lo tanto el efecto fitotóxico del herbicida abarca a la globalidad de los órganos y tejidos celulares aunque son los orgánulos como el cloroplasto, por la aplicación directa sobre la superficie foliar y el nódulo, por ser un órgano consuntivo, los que posiblemente son más afectados.

En nuestros resultados los efectos observados por el glifosato sobre la ultraestructura del cloroplasto fueron igualmente drásticos y dependientes de la concentración y del tiempo de aplicación, si bien en todas las concentraciones se destacó la coexistencia de cloroplastos afectados en su estructura con cloroplastos no afectados. Los efectos progresivos descritos se asemejan a los producidos en procesos de senescencia precoz. En las células del mesófilo comenzaron por una serie de cambios en la ultraestructura del grana e intergrana con pérdida de la orientación paralela al eje del cloroplasto. Se sucedieron cambios en los sistemas de membrana, con la deformación e incluso la ruptura en el caso del tonoplasto. Éstos son consecuencia de la pérdida de la integridad y de la compartimentación celular, con lo que las membranas estarían expuestas a los componentes de la vacuola liberados y entre éstos las enzimas hidrolíticas (de Felipe *et al.*, 1986). Además se produjo un aumento de la densidad electrónica en el estroma por la intensa actividad proteolítica existente. Esta característica, junto con un incremento de glóbulos lipídicos y/o plastoglóbulos se presenta generalizada en tratamientos con herbicidas como cianazina, simazina e isoproturon (de Felipe *et al.*, 1986; 1987, 1988; Fernández-Pascual *et al.*, 1988), posiblemente como consecuencia de la pérdida lipídica sufrida por las membranas.

Finalmente, a la concentración 10 mM el citoplasma se presentó degradado y lleno de vesículas, con un sistema lamelar desintegrado y en algunos casos, con la presencia de tilacoides con orientaciones curvas. Tratamientos de estrés salino también inducen la degradación del citoplasma, así como la vacuolización y destrucción del tonoplasto (Mitsuya *et al.*, 2000). Esta degradación del citoplasma la atribuyen a la formación de vacuolas con función lítica marcadas por la presencia de proteasas. En la activación de las enzimas hidrolíticas participan también proteínas derivadas de las vesículas del Golgi acumuladas en la vacuola (Jauh *et al.*, 1999).

Vaughn y Duke, 1986, en estudios previos en soja con glifosato, observaron una diferente organización en el apilamiento de las lamelas estromáticas, con una forma espiralada compacta. Esta particular alteración del apilamiento del tilacoide aparece en un gran número de estreses abióticos (temperatura, agentes fitotóxicos, alta luminosidad) y puede representar a una membrana fotosintética en que todos los complejos que captan la luz son desfosforilados, una condición que lleva al apilamiento máximo del tilacoide (Vaughn y Duke, 1986). En nuestras observaciones, en algunos casos, la estructura tilacoidal también presenta un alto grado de compactación con formas curvadas, si bien en otros cloroplastos se produce un aumento en número del grana, paralelamente al incremento de tilacoides que lo constituyen. Este incremento en las estructuras del grana y reducción del intergrana había sido descrito por de Felipe *et al.*, 1986 en tratamientos con el herbicida isoproturon en *Triticum sativum* y *Lolium rigidum*,

así como en tratamientos con diferentes fuentes de nitrógeno descritos por Golvano y de Felipe, 1986 en *Triticum vulgare*.

Estas alteraciones descritas en los cloroplastos, no sólo se producen en tratamientos con herbicidas (Fernández-Pascual *et al.*, 1988; de Felipe *et al.*, 1986, 1987, 1988) sino que también se inducen respuestas similares con otros estreses abióticos, como cloruro sódico (Mitsuya *et al.*, 2000), metales pesados (McCarthy *et al.*, 2001) e incluso en estreses bióticos (Pérez, 2003).

#### 4. Efecto del glifosato sobre la leghemoglobina

La leghemoglobina en los nódulos de las leguminosas proporciona a los bacteroides una concentración de oxígeno óptima para el mantenimiento de las actividades respiratorias y nitrogenasa. La disminución en el contenido de Lb en plantas de *Lupinus albus* tratadas con nitrato se ha relacionado con el descenso de la actividad nitrogenasa (Vivo *et al.*, 1989). Este tipo de respuesta ha sido observada también por otros autores, con la aplicación del herbicida paraquat en raíces (Marino *et al.*, 2003); después de un aporte exógeno de ácido abscísico a las plantas simulando una situación de estrés intenso (González *et al.*, 2001) o induciendo estrés hídrico en plantas de guisante (Irigoyen *et al.*, 1992). Cambios en los niveles de leghemoglobina han sido descritos en otros estreses abióticos, como salinidad (Fernández-Pascual *et al.*, 1996), oscuridad (Gorgorcena *et al.*, 1997; Hernández-Jiménez *et al.*, 2002) o nitrato (Escuredo *et al.*, 1996; de Lorenzo, 1992), y relacionados en parte con el declive en la fijación de nitrógeno.

En general, existe una relación positiva entre fijación de N<sub>2</sub> y el contenido en Lb, así ambos parámetros varían en paralelo durante el desarrollo o senescencia del nódulo, pero los cambios en la actividad nitrogenasa preceden generalmente a los de la Lb total (Guasch *et al.*, 2001; Hernández-Jiménez *et al.*, 2002).

Nosotros hemos encontrado que el efecto del glifosato sobre el contenido de Lb fue posterior a la inhibición de la actividad nitrogenasa. En los tratamientos con glifosato, la actividad nitrogenasa se redujo drásticamente a las 24 horas, mientras que el descenso en el contenido de Lb tuvo lugar en los nódulos a los 7 días de tratamiento.

Hasta el momento no existen referencias sobre el efecto de glifosato en el contenido de leghemoglobina, si bien Hoagland *et al.*, 1999 en un estudio comparativo, en experimentos de campo, entre la soja convencional y la soja resistente al glifosato (Roundup-Ready), señalaron a los 7 días, una reducción del contenido de Lb del 10% y del 18% con concentraciones de 1,12 kg Ha<sup>-1</sup> y 2,24 kg Ha<sup>-1</sup> respectivamente, en ambas variedades de soja. En nuestros resultados el descenso de la Lb en los nódulos de *Lupinus albus* a los 7 días fue muy superior, del 76% con 5 mM y una bajada total con 10

mM (1,12. Kg Ha<sup>-1</sup>). No obstante, estas diferencias no se explican por una menor tolerancia del lupino frente a la soja sino por las diferentes condiciones ambientales y experimentales de ambos estudios.

Estos cambios señalados producidos por el glifosato sobre la Lb en el patrón proteico del citosol vegetal se corresponden con la disminución del número de partículas de oro coloidal, detectadas por microscopía electrónica en la inmunolocalización de la hemoproteína. A pesar de la diferente afectación del herbicida sobre la zona infectada del nódulo, al coexistir en su interior células infectadas intactas y células alteradas en su estructura repletas de bacteroides degenerados, la disminución de las partículas de oro localizadas es significativa a partir de 2,5 mM después de 5 días. Mientras la actividad nitrogenasa está severamente afectada desde 1 día con la menor dosis (1,25 mM). Estos datos nuevamente corroboran que el efecto del glifosato sobre el contenido de Lb fue posterior a la inhibición de la actividad nitrogenasa.

La inmunolocalización de la leghemoglobina, como había sido ya descrito por Vivo *et al.*, 1989, la sitúa mayoritariamente en el citosol de las células infectadas del nódulo y es en las células con los bacteroides degenerados donde los niveles de Lb disminuyeron drásticamente.

La inhibición de la ruta de biosíntesis de aminoácidos aromáticos por el glifosato (Herrmann y Weaver, 1999) y por consiguiente las proteínas derivadas de éstos podría contribuir al descenso de la hemoproteína. Esta bajada de la Lb podría limitar el flujo de O<sub>2</sub> al bacteroide en las células de la zona infectada, afectando a la respiración bacteroidal asociada a la nitrogenasa y por consiguiente a la fijación de nitrógeno, como han descrito de Lorenzo *et al.*, 1993; Iannetta *et al.*, 1993 y Guasch *et al.*, 2001.

En plantas de *Lupinus albus*, durante el proceso de envejecimiento y senescencia natural, el descenso en el contenido de Lb se ha relacionado con la oxidación de la hemoproteína a la forma inactiva ferriLb (LbIV) por las especies activas de oxígeno, lo que podría conducir a su degradación por proteasas (Hernández-Jiménez *et al.*, 2002). Otros autores han relacionado dicho descenso de la Lb con la disminución en los niveles de su biosíntesis, en consecuencia al control transcripcional o transduccional en los nódulos (Ragland y Theil, 1993). Procesos similares podrían tener lugar en los nódulos del lupino por la toxicidad del glifosato, cuyos efectos en los tejidos celulares de la planta son comunes a la senescencia (Fernández-Pascual *et al.*, 1992, 1996).

En las alteraciones del metabolismo proteico con glifosato, la disminución en el contenido Lb, se produce en paralelo con la disminución del resto de proteínas citosólicas. Por el contrario, con un aporte de nitrato, la concentración de los componentes de la leghemoglobina en soja hipernodulada disminuyó, sin embargo el



declive de las proteínas no fue correlativo con la leghemoglobina (Nishiwaki *et al.*, 1997; Sato *et al.*, 1999).

## 5. Metabolismo carbonado

### 5.1. Sacarosa y almidón

La fijación de nitrógeno de los bacteroides depende de la disponibilidad de carbohidratos necesarios para los procesos metabólicos de las células del nódulo. En el caso de que la síntesis de carbono sea superior a la demanda metabólica el carbono se acumula en forma de almidón en los nódulos (Forrest *et al.*, 1991), existiendo mecanismos implicados en la conversión sacarosa-almidón. Proponiéndose para el control de la distribución del carbono fijado entre sacarosa y almidón, la demanda citosólica de carbono (Fondy *et al.*, 1989).

La acumulación de sacarosa en el nódulo sujeto a estrés hídrico en plantas de guisante ha sido relacionado con el descenso de la actividad nitrogenasa (González *et al.*, 1995) y por el contrario la disminución en el flujo de carbono al nódulo, también lleva a un declive en la fijación de nitrógeno (Arrese-Igor *et al.*, 1999). De la misma forma, los efectos adversos provocados por los herbicidas han sido atribuidos por algunos autores a una disminución del aporte de fotosintetizados al nódulo (Sprout *et al.*, 1992), si bien recientemente en tubérculos de patata se ha comprobado que la regulación de la síntesis de almidón y la degradación de sacarosa responde no sólo a la disponibilidad de sacarosa sino también a la del oxígeno (Geigenberger, 2003).

Por consiguiente, el glifosato podría intervenir en la alteración del metabolismo nodular, mediante la limitación en el aporte de carbohidratos desde la parte aérea, necesarios para la incorporación del nitrógeno fijado y para la respiración bacteroidal.

En nuestros resultados la reducción en la acumulación de almidón en nódulos de lupino es posterior a la inhibición de la actividad nitrogenasa. El descenso en el contenido de almidón tuvo lugar a partir de 3 días de tratamiento en altas concentraciones, 5 mM y 10 mM. En este mismo sentido, Servaites *et al.*, 1987 describieron un descenso severo en la acumulación de almidón en hojas de remolacha tratadas con glifosato. Este descenso estaba en proporción con la ruta de intercambio de carbono, a pesar de que la ruta de síntesis de sacarosa permanecía inalterable con respecto al control. Estos autores atribuyeron esta inhibición de la síntesis de almidón por el glifosato, al descenso en los niveles del ácido 3-fosfoglicérico (PGA) y consecuentemente a la reducción del ratio Pi/PGA del cloroplasto, lo que conllevaría a que el Pi no fuera secuestrado por otros intermediarios y a la reducción de la actividad ADP-glucosa fosforilasa, enzima implicada en la regulación de la síntesis de almidón (Shied *et al.*, 1991). En conclusión, los cambios en el metabolismo del carbono fotosintético inducidos por el glifosato podrían ser

causados por el desvío de carbono desde el ciclo reductivo de las pentosas-P para la síntesis de otros metabolitos como mayoritariamente los de la ruta del ácido shikímico. Asimismo, Geiger *et al.*, 1987 sugiere que el efecto del glifosato es debido a cambios en la distribución del carbono para el almidón y la sacarosa, y no interfiere con procesos de carga floemática o transporte.

La disminución del contenido de almidón, determinada espectrofotométricamente, se corresponde con la reducción del número de amiloplastos observados por microscopía óptica en la estructura celular del nódulo. La disposición periférica de las acumulaciones amiloplásticas en la zona de la interfase zona infectada-corteza y alrededor de los espacios intercelulares de la zona infectada y del citoplasma no muestra diferencias claras, tanto en la corteza como en la zona infectada cuando el tratamiento es de 1 día. Por el contrario, se observa una disminución progresiva de los gránulos de almidón y del contenido bioquímico de éste conforme aumenta el tiempo de exposición y la dosis de glifosato. En este mismo sentido, recientemente, han sido descritos cambios en la acumulación de amiloplastos en nódulos de una variedad de guisante cuando la planta se aclimata a las diferencias de temperatura entre las estaciones de invierno y verano (Chinnasamy y Bal, 2003).

El glifosato, por el contrario, aumenta los niveles de sacarosa en los nódulos de lupino. Este incremento, de forma progresiva en el tiempo y con el tratamiento, es significativo a partir de la concentración 10 mM con 3 días y a partir de 2,5 mM en tiempos más largos en exposición. En tratamientos con el herbicida imazetapir también se observa una acumulación de sacarosa en hojas y nódulos de plantas de guisante en tratamientos largos, aunque contrariamente a nuestros resultados el contenido de almidón también se incrementa, sugiriéndose que la sacarosa es transportada en una proporción más alta que los sumideros pueden utilizar, por lo que se acumula tanto en la fuente como en los sumideros (Royuela *et al.*, 2000). Estos resultados son coincidentes con los observados recientemente por Gaston *et al.*, 2002 en los que el tratamiento con imazetapir provocó un aumento de carbohidratos solubles y de almidón, en raíces y hojas.

La respuesta del lupino con respecto al metabolismo carbonado frente al tratamiento con glifosato, está en concordancia con lo observado en tratamientos con altas concentraciones de NaCl durante 6 días (Fernández-Pascual *et al.*, 1996), sin embargo no se corresponde con los resultados obtenidos en tratamientos con nitrato, en los que se observa una disminución del contenido de sacarosa (Lang, 1990), así como en tratamientos de bajas concentraciones de oxígeno que incrementan el contenido de almidón (Guasch, 1998).

De igual forma, estudios previos han descrito que determinadas condiciones de estrés abiótico como salino (Delgado *et al.*, 1993), térmico (Stitt y Hurry, 2002) e hídrico (Pinheiro *et al.*, 2001), conllevan variaciones en el contenido de almidón y sacarosa relacionándolas con procesos de regulación osmótica.

A pesar de la inhibición de la síntesis de almidón, los resultados en el incremento de sacarosa por el glifosato sugieren que la disponibilidad de carbohidratos en plantas tratadas no estaba limitada para satisfacer sus requerimientos energéticos y por tanto para la fijación de nitrógeno, además de la posibilidad de reflejar una disminución de la ruta glucolítica (Gaston *et al.*, 2002). La reducción en el contenido de almidón podría estar en relación con la alteración en la ruta de biosíntesis de aminoácidos aromáticos causada por el glifosato, al provocar una movilización de almidón y un secuestro masivo de esqueletos carbonados de las rutas metabólicas como la glucolisis y el ciclo de Calvin, a la ruta del ácido shikímico, lo que provocaría un flujo descontrolado de carbono hacia la formación de compuestos derivados como es el ácido shikímico y compuestos fenólicos. No obstante, los cambios en la concentración de carbohidratos de los nódulos de lupino no pueden explicar por sí solos la disminución en la fijación de nitrógeno, más bien podrían ser una consecuencia de ésta.

## 5.2. Sacarosa sintasa

La sacarosa sintasa se considera una enzima clave en el metabolismo nodular, regulando el flujo de carbono en condiciones de estrés (Arrese-Igor *et al.*, 1999). La inhibición de la actividad sacarosa sintasa se ha relacionado con la disminución de la fijación de nitrógeno en diferentes estreses abióticos (Gordon *et al.*, 1993; 1997; Cabrerizo *et al.*, 2001), aunque no existen referencias previas en tratamientos con herbicidas. En sentido contrario, González *et al.*, 2001 observaron, bajo la aplicación exógena de ABA, un descenso de la actividad nitrogenasa en nódulos de guisante, pero no afecto a la actividad SS, sugiriendo que la fijación no es enteramente dependiente del aporte de carbono, solamente disponible para la actividad SS.

La respuesta de la SS al estrés abiótico del glifosato es una inhibición progresiva con el tiempo de tratamiento y con la dosis de herbicida aplicada, sin diferencias significativas hasta los 5 días con la dosis 10 mM. El descenso en la actividad SS es también correlativo con los cambios de los carbohidratos en los nódulos, aunque la acumulación de sacarosa es anterior a la inhibición de la actividad enzimática. Si la SS controla el flujo de carbono y energía del bacteroide, el descenso de la actividad SS podría ser la respuesta al aumento en la concentración de sacarosa en el citosol nodular y del declive en la fijación de nitrógeno. Además la SS podría estar involucrada en la síntesis de almidón, lo que explicaría el descenso de los niveles de almidón

paralelamente al descenso de la SS, ya que en otros tejidos, la SS juega un importante papel en la conversión sacarosa-almidón (Pozueta-Romero *et al.*, 1999) a través de la conversión de UDP-glucosa a ADP-glucosa (Kleczkowski, 1996). A pesar de que en raíz de plantas de guisante ha sido demostrada la capacidad de transporte de los amiloplastos para glucosa-1-P, glucosa-6-P, ATP y ADP-glucosa (Borchert *et al.*, 1993; Schunemann *et al.*, 1993), no existe todavía información suficiente sobre la translocación del citosol a los plastidios en nódulos de leguminosas, que nos permita confirmar este transporte.

Finalmente, no podemos descartar que la respuesta del nódulo al herbicida con el descenso de la actividad SS, pueda ser consecuencia de la inhibición de la expresión del gen *ss* (Gordon *et al.*, 1997) o de desajustes en las modificaciones post-transcripcionales covalentes como la fosforilación/desfosforilación que la actividad enzimática *in vivo* sufre (Zhang y Chollet, 1997; Nakai *et al.*, 1998), en respuesta a las alteraciones que provoca el glifosato.

Por otro lado, la SS puede estar regulada por un número de factores fisiológicos en nódulos y puede encontrarse en correlación inversamente lineal con la concentración de sacarosa en el tratamiento con glifosato. Sin embargo, la inhibición de la actividad en el nódulo parece ser la causa de la acumulación de sacarosa y no a la inversa. En este sentido, González *et al.*, 1998 analizaron la actividad SS y la acumulación de sacarosa de nódulos de guisante sometidos a estrés hídrico mostrando que el descenso de la actividad SS precede a los cambios en los niveles de sacarosa.

Según nuestros resultados, el descenso de la actividad enzimática SS tras la exposición del herbicida glifosato tampoco es causa suficiente que justifique el descenso de la actividad nitrogenasa, además de que el contenido de sacarosa acumulado descartaría como posible causa el efecto indirecto del glifosato debido a la limitación de esqueletos carbonados al nódulo vía floema.

### 5.3. PEPc, MDH y AST

En respuesta al tratamiento con glifosato las actividades enzimáticas del citosol nodular, PEPc, MDH y AST, disminuyeron a partir de una concentración de 2,5 mM y con un tiempo de exposición de 5 días. Pero el descenso fue posterior con respecto a la inhibición de la fijación de nitrógeno.

La actividad conjunta de estas enzimas en el citosol contribuye a producir en los nódulos gran cantidad de ácido málico y otros ácidos orgánicos a partir del oxalacetato que puede servir como fuente de energía y de carbono para el bacteroide (Golvano *et al.*, 1991). En este sentido algunos autores relacionaron la inhibición de la actividad fijadora de nitrógeno con la actividad de estas enzimas (Lang, 1990; Vance y Heichel, 1991),

proponiendo que la causa de la inhibición sería debida a que la tasa de actividad en algunos pasos intermedios en el metabolismo de carbono podría estar limitada (Lang *et al.*, 1993). Asimismo, González *et al.*, 2003, sugieren la implicación de la PEPc, como posible sitio regulador para los sustratos oxidables de los bacteroides fijadores de nitrógeno en la economía de carbono de la planta de maíz e indicaron el importante papel que juega la PEPc en la adaptación de la planta al estrés abiótico, produciendo un aumento e inducción de la expresión del gen de PEPc y afectando también al balance hídrico.

Contrariamente a nuestros resultados, en estudios de estrés hídrico (Irigoyen *et al.*, 1992) y salino (Delgado *et al.*, 1993), se han descrito incrementos de las actividades enzimáticas, así como en tratamientos con nitrato. Lang *et al.*, 1993, observaron una respuesta diferencial dependiendo del tiempo de exposición al estrés abiótico y de la isoforma enzimática determinada, citosólica o bacteroidal en nódulos de lupino. En el citosol bacteroidal, las enzimas MDH y AST a los 2 días mostraron un incremento inicial que con la posterior proteólisis bacteroidal descendió, mientras la forma citosólica celular descendió en el tiempo con el tratamiento. Estos autores sugieren que la falta de oxígeno puede ser responsable del aumento de las actividades de PEPc y MDH de los nódulos. En este sentido, Robinson *et al.*, 1996, localizaron la presencia de la proteína PEP y de un promotor específico implicado directamente en la expresión del gen que la codifica en el parénquima nodular, sugiriendo que el malato derivado del OAA sintetizado vía PEPc debe ser un factor en la regulación de la barrera variable a la difusión de O<sub>2</sub>.

Cuando el tiempo de exposición es corto, 1 día, contrariamente se incrementan las actividades enzimáticas bajo el efecto del glifosato, siendo significativo con dosis de 5 mM y 10 mM. No existen referencias previas sobre el efecto del glifosato, ni de herbicidas sobre las actividades enzimáticas descritas, si bien en la mayoría de los estreses abióticos estudiados se ha observado un aumento de estas actividades (Johnson *et al.*, 1994; López-Millán *et al.*, 2000; Ma *et al.*, 2001). Así, recientemente Gouia *et al.*, 2003 observaron que en plantas de judía tratadas con Cadmio se inducía la actividad PEPc, posiblemente por una síntesis *de novo* o por una activación de la enzima, y aunque no son bien conocidos aún los mecanismos envueltos sobre la actividad enzimática, sugieren que es una consecuencia del reajuste en la coordinación entre el metabolismo de C y N, por la toxicidad del metal al acumular niveles tóxicos de amonio. Además, Johnson *et al.*, 1994 han descrito alteraciones en el metabolismo de raíces proteoides de *Lupinus albus* bajo estrés con fósforo y en raíces normales crecidas en presencia y ausencia de fósforo. En estos experimentos observaron un aumento de las actividades enzimáticas *in vitro* MDH y PEPc analizadas y de la fijación de CO<sub>2</sub> *in vivo* en raíces proteoides en relación con las raíces normales. Asimismo, en condiciones de estrés

hídrico en nódulos de plantas de judía, el descenso del ARA fue acompañado de un marcado declive en los niveles de los transcritos de la isoforma (*PvAAT-2*) de AST, lo que sugiere que la AST-2 estaría implicada en el mecanismo de síntesis de compuestos nitrogenados en nódulos de judía (Silvente *et al.*, 2003).

Estudios previos de la actividad PEPc en nódulos de soja encontraron que un marcado aumento en la sensibilidad a la inhibición por el malato era asociado con tratamientos que inhibieron la actividad de la nitrogenasa (Zhang *et al.*, 1995). No obstante Smith *et al.*, 2002, observaron en nódulos de *Vigna unguiculata* que la actividad PEPc a corto plazo mostró evidencia de un aumento en la sensibilidad a la inhibición por el malato bajo deficiencia en N<sub>2</sub>, aunque los niveles de la proteína fueron estables.

En general, las respuestas de las actividades enzimáticas del metabolismo nodular en presencia de glifosato, muestran tendencias correlativas con las anteriormente comentadas. El descenso mostrado de las actividades PEPc, MDH y AST, junto con los niveles de almidón, así como la actividad SS, no pueden explicar por sí solos la drástica respuesta de la fijación de nitrógeno, puesto que la acumulación de la sacarosa justificaría la existencia de esqueletos carbonados para el metabolismo nodular. Así, el descenso de estas actividades enzimáticas y del almidón por la acción del glifosato podría ser debido al agotamiento del carbono o fosfato o ambos desde el ciclo reductivo de carbono de la fotosíntesis y síntesis de almidón o debido a la inhibición de la ruta del ácido shikímico.

## 6. Efecto del glifosato sobre el crecimiento de *Bradyrhizobium* sp (*Lupinus*)

La ruta del ácido shikímico no sólo está presente en plantas sino que también se encuentra en bacterias y hongos, siendo por tanto susceptibles de ser también afectados por el glifosato. Por otra parte, la flexibilidad fenotípica y genotípica, así como la versatilidad que muestran los rizobios frente a condiciones de estrés abiótico, además de su implicación en los cambios bioquímicos y fisiológicos que se producen en la planta en simbiosis, les convierte en uno de los objetivos de nuestro estudio, ya que podríamos discernir si el efecto observado sobre la simbiosis por el glifosato pudiera ser debido a un efecto directo sobre el *Bradyrhizobium* o sobre la planta.

Al comparar en nuestros resultados la sensibilidad al glifosato en los dos simbiontes involucrados en la fijación simbiótica, la bacteria *Bradyrhizobium* sp. (*Lupinus*) y la planta *Lupinus albus*, se evidencia que el macrosimbionte es menos sensible al glifosato que el microsimbionte, ya que mientras la planta a la mínima concentración ensayada (1,25 mM) no muestra síntomas aparentes producidos por el herbicida, el crecimiento del rizobio estaba totalmente inhibido. Estos resultados son contrarios a los descritos por de Felipe *et al.*, 1987 en nódulos de lupino tratados con Lindex y simazina,

así como los descritos por González *et al.*, 1996 en nódulos de guisante tratados con imazetapir, en los que el crecimiento del *Bradyrhizobium* y del *Rhizobium* respectivamente, no se vio afectado por los herbicidas utilizados.

El crecimiento de las dos cepas testadas, ISLU16 y L750 y de la viabilidad de ambas se mostró severamente afectado con el tratamiento, a través de un descenso en el crecimiento en vida libre del microorganismo, resultando ser la cepa ISLU16 la más tolerante al herbicida. Otros estudios han encontrado reducciones similares en el crecimiento bacteriano cuando el glifosato es añadido al medio (Santos y Flores, 1995; Krzysko-Lupicka y Orlik, 1997; Busse *et al.*, 2001). Además la sensibilidad de *B. sp.* (*Lupinus*) al glifosato está influenciada por la concentración y la cepa bacteriana. La variabilidad en la sensibilidad al glifosato ya había sido constatada previamente por Moorman *et al.*, 1992 entre cepas de *Bradyrhizobium japonicum*. Paralelamente, Martensson, 1992 que analizó la tolerancia a los agroquímicos, incluyendo fungicidas, herbicidas y metales pesados, en *Trifolium pratense*, *Medicago sativa* y *Lotus corniculatus* indicó que ninguno de los rizobios ensayados, *R. leguminosarum* *bv. trifolii*, *R. meliloti* y *R. loti*, fue tolerante a todos los compuestos químicos, reincidiendo en la sensibilidad variable de cada cepa y a los distintos agroquímicos. Además señaló que la bacteria con capacidad de supervivencia en metales pesados y agroquímicos, debía haber perdido su efectividad simbiótica con el tiempo, ya que la inducción de nódulos fue afectada en el caso del glifosato y Zn. Otro estudio más reciente de Hernández *et al.*, 1999 compara el efecto diferencial del glifosato sobre el crecimiento en vida libre de 3 cepas de *B. japonicum*, observando en cada cepa, como característica propia, una sensibilidad variable al glifosato.

Entre los factores que son la base de la distinta tolerancia al glifosato en los microorganismos y que determinan la toxicidad del herbicida se encontrarían, el déficit de los productos finales (Cole, 1985) tras la inhibición de la enzima EPSPs y el incremento de las actividades de la ruta del ácido shikímico pudiendo secuestrar esqueletos carbonados de otras rutas esenciales (Devine *et al.*, 1993), concomitantemente con el aumento de los intermediarios fenólicos (Moorman *et al.*, 1992). Además entre los mecanismos que explicarían la variabilidad en la sensibilidad al glifosato podría estar la degradación del herbicida. En este sentido ya es conocido que los rizobios contienen sistemas enzimáticos constitutivos e inducibles para el catabolismo de diversos compuestos como mono y disacáridos, alcoholes azucarados, glicerol, intermediarios del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (succinato y malato), una vitamina, un antibiótico órgano-fosforado y diversos compuestos aromáticos (McGrath *et al.*, 1998). La degradación del glifosato se llevaría a cabo por parte de la familia *Rhizobiaceae*, utilizando el glifosato (N-fosfonometilglicina) como única fuente de fósforo para su crecimiento, al

romper la molécula por el enlace carbono-fósforo a través de una fosfoliasa (Liu *et al.*, 1991). Otro posible mecanismo que podría intervenir en la tolerancia de los rizobios, sería la resistencia de la enzima EPSPs al herbicida o la sobreproducción de la misma. Hasta la fecha, mediante técnicas de ingeniería genética, ha sido posible el incremento en tolerancia en el genoma de la planta (Pline *et al.*, 2002), pero no existen referencias previas en la adquisición de la capacidad de resistencia, natural e inducida, en las especies de rizobio. Como se ha descrito, también la masiva producción de intermediarios que son liberados al medio (Moorman *et al.*, 1992) acumulándose sin control podría causar efectos tóxicos sobre el crecimiento, a pesar de la capacidad de los rizobios de poder degradar estos compuestos. Asimismo, la variabilidad de cada cepa en los componentes y ordenación de éstos en la pared, podría afectar la entrada del herbicida al interior de la bacteria.

## 7. Efecto del glifosato sobre el metabolismo fenólico

Del carbono fijado por la planta, aproximadamente el 20% es normalmente encauzado a través de la ruta del ácido shikímico. La desregulación de la ruta del ácido shikímico provocada por la inhibición del enzima EPSPs del glifosato, tiene además un efecto indirecto importante que es la producción y acumulación del ácido shikímico (Amrhein *et al.*, 1980) y de ácidos hidroxibenzoicos, los cuales potencialmente pueden resultar tóxicos (Becerril *et al.*, 1989), al afectar al metabolismo celular. Nuestros resultados evidencian una rápida traslocación del herbicida vía floemática a sumideros metabólicos como hojas en desarrollo y nódulos, ya que la acumulación del ácido shikímico tiene lugar desde las primeras 24 horas. Esta rápida acumulación está de acuerdo con los resultados obtenidos por Stasiak *et al.*, 1992, así como con los experimentos llevados a cabo por Wan Kim y Amrhein, 1995 en los que también se encontraron acumulación de ácido shikímico inducido por el glifosato a las 24 horas de tratamiento en plantas de tomate.

Teniendo en cuenta la rápida traslocación del herbicida y la lenta degradación del glifosato en plantas superiores (Devine *et al.*, 1993), un sumidero metabólico como el nódulo podría acumular altos niveles del herbicida. Si bien en nuestros experimentos no hemos determinado la concentración de glifosato en los nódulos, sin embargo podemos demostrar indirectamente su presencia analizando sus efectos en los compuestos derivados de la ruta del shikimato en nódulos. Cuando aplicamos dosis de glifosato y tiempo de exposición altos, el contenido de los ácidos fenólicos, shikímico y protocatéquico (PCA) se alteró provocando una acumulación continua y progresiva en los nódulos. Este efecto se demostró desde concentraciones muy bajas, e incluso con la mínima concentración utilizada, 1,25 mM, y desde el primer día, lo que puso de



manifiesto que los ácidos fenólicos son los únicos de entre los parámetros estudiados que se modifican previamente a la concentración 2,5 mM. Por consiguiente su acción directa sobre los procesos celulares y su efecto indirecto a través de la acumulación de compuestos tóxicos podría explicar el rápido descenso de la actividad nitrogenasa al interferir en los procesos de fijación de nitrógeno del bacteroide. Esto confirmaría la importancia de los ácidos shikímico e hidroxibenzoicos en la toxicidad del glifosato sobre la fisiología de la nitrogenasa, ya que, como se ha comentado, la destrucción de la enzima fue posterior a la caída de la actividad del sistema nitrogenasa altamente sensible al glifosato, por lo que dirigiría su efecto sobre la regulación fisiológica de la enzima. No obstante, por el contrario en nódulos de plantas de soja Hernández *et al.*, 1999 no hallaron una correlación entre los niveles de acumulación de las ácidos shikímico y PCA en nódulos y la inhibición del ARA en bacteroides extraídos de estos nódulos, ni estos compuestos ni el propio herbicida tenían los efectos críticos en el proceso de fijación de nitrógeno.

Dado que la acumulación de shikimato es función de la concentración de glifosato y de la regulación metabólica, nuestros resultados ponen de manifiesto que el herbicida es principalmente traslocado a hojas en desarrollo. A pesar de que las hojas maduras son las que reciben mayoritariamente el herbicida, las hojas jóvenes son las que presentan mayor acumulación de fenoles, debido a la rápida traslocación del glifosato hacia los sumideros consuntivos al no poder ser fácilmente degradado. Si el efecto fitotóxico se corresponde con el grado de aumento con respecto al control que se produce de shikimato en los tejidos, son igualmente las hojas jóvenes las más afectadas. Este resultado es similar al descrito por Hernández *et al.*, 1999 en plantas de soja tratada con glifosato durante 7 días.

El glifosato causó una mayor acumulación del derivado hidroxibenzoico, PCA que la del propio precursor, el ácido shikímico, como consecuencia de la pérdida de regulación en la ruta causada por el glifosato. Sin embargo, no presenta efecto sobre otros derivados hidroxibenzoicos: ácido gálico, gentísico, 4-OH-hidroxibenzoico, siríngico y vanílico lo que sugiere que los niveles de estos ácidos hidroxibenzoicos son más fuertemente regulados por la planta que sus precursores el ácido shikímico y PCA, durante el tiempo analizado, ya que en tratamientos con dosis subletales es posible que el efecto no sea duradero, recuperándose la actividad de estos compuestos (shikímico y PCA) a las pocas semanas, como ha sido descrito en plantas de *Abutilon* (Becerril *et al.*, 1989). No obstante, recientes estudios en plantas de *Triticum aestivum* han demostrado que la aplicación del glifosato en presembrado induce acumulación de ácido shikímico en la planta y subsecuentemente, aunque en menor grado, en sus productos de elaboración,

como el pan (Bresnahan *et al.*, 2003), lo que indica la permanencia de este compuesto en algunos órganos de la planta.

Ahora bien aunque la EPSPs es la enzima responsable de la acumulación de estos compuestos, con la inserción de un gen foráneo que codifique una variante de la enzima EPSPs (diana del herbicida) que no es inhibida por el glifosato, también se produce acumulación de compuestos fenólicos. Así, estudios recientes en variedades de algodón tolerantes al glifosato describen la acumulación de ácido shikímico en todos sus tejidos, aunque en menor grado que la variedad susceptible al glifosato (Pline *et al.*, 2002). También Mueller *et al.*, 2003 encontraron acumulación de ácido shikímico en *Conyza canadensis* con un diferente patrón de acumulación entre los biotipos resistentes y los susceptibles.

El glifosato además provocó un diferente grado de acumulación según el tejido. En los nódulos, la acumulación de estos ácidos fue menor, esta distribución sería debida a una menor translocación del herbicida, así como de fotosintetizados desde las hojas donde es aplicado el herbicida.

Por otra parte, un aspecto destacado en este análisis, fue que la acumulación de intermediarios fenólicos, que refleja de forma indirecta el daño causado por el herbicida, es menor en plantas noduladas que en plantas tratadas con nitrato. En este sentido, como ya hemos comentado, la planta en simbiosis es más tolerante a los herbicidas que las plantas regadas con nitrato (González *et al.*, 1996; Royuela *et al.*, 1998), por lo que las condiciones simbióticas proporcionarían una mayor defensa frente al estrés abiótico del herbicida glifosato en comparación con el aporte de nitrato a estas leguminosas.

## **8. Alteraciones producidas por el glifosato sobre el metabolismo proteico**

El metabolismo de proteínas, incluido el contenido proteico y el patrón polipeptídico del citosol en hojas, nódulos y bacteroides, como hemos comprobado se muestra afectado con el tratamiento con glifosato. Además el efecto del glifosato sobre el contenido proteico nodular se manifestó posteriormente a la inhibición de la actividad nitrogenasa, ya que mientras la fijación de nitrógeno disminuye rápidamente, el contenido de proteínas solubles del citosol nodular y bacteroidal descendió significativamente a partir de 5 días de tratamiento, a partir de la concentración 2,5 mM. Sin embargo, en nódulos de plantas de soja el herbicida glifosato no presentó ningún efecto sobre la concentración de proteína bacteroidal y citosólica, e incluso a los 21 días se observaba en el citosol celular un aumento del 20-24% (Hernández, 1996).

Estudios previos en nuestro departamento con otros herbicidas han demostrado resultados similares en el metabolismo proteico, dependiendo del herbicida empleado. Experimentos llevados a cabo por Fernández-Pascual *et al.*, 1992 con los herbicidas

alacloro, carbetamida, metribuzina y benfluralina, pusieron de manifiesto cambios en el metabolismo proteico de la planta. El contenido en proteínas solubles del citosol nodular fueron significativamente menores que el control con los cuatro herbicidas añadidos, si bien las proteínas bacteroidales no experimentaron variaciones con ninguno de los tratamientos. El contenido de proteínas en las hojas no siguió el mismo patrón, sólo disminuyó con el herbicida alacloro, mientras que con benfluralina no se observó efecto alguno y con carbetamida y metribuzina aumentó. En nuestros resultados también se observa un incremento significativo en el contenido proteico en hojas, como con carbetamida y metribuzina, cuando la concentración de glifosato es de 10 mM después de 7 días de tratamiento. En este mismo sentido, en tratamientos con cianacina y linuron, el metabolismo proteico de hojas se incrementó, fundamentalmente con la cianacina. No obstante, el aspecto más destacado en este aumento fue la detección de un nuevo polipéptido de 17 kDa en el patrón proteico de hojas cuando la concentración aplicada fue de 20  $\mu$ M de cianacina y de 80  $\mu$ M de linuron. Los cambios en el patrón polipeptídico son atribuidos por Fernández-Pascual *et al.*, 1988 a una síntesis *de novo* inducida por el tratamiento con los herbicidas, aunque tampoco se descarta la posibilidad de que éste pueda ser un producto de degradación de la subunidad grande (Sg) de la enzima cloroplástica, D-ribulosa-1,5-bifosfato carboxilasa/oxigenasa (Rubisco).

Nuestros resultados demuestran que el glifosato produce alteraciones en el patrón polipeptídico de hojas y nódulos. Si bien en la documentación revisada no existen referencias previas al respecto siendo éste el primer estudio realizado en este sentido.

En hojas se produce una disminución del contenido de la Sg, a pesar de no ser significativa hasta los 4 días con dosis de 10 mM; y en nódulos, como hemos señalado anteriormente, una disminución de la leghemoglobina citosólica. Geiger, 1986 ya describió al glifosato como un inhibidor muy débil de la actividad Rubisco, por lo que la inhibición de esta enzima, como consecuencia de la falta de regeneración de la ribulosa bifosfato (RuBP), sería atribuida más bien al desvío de la eritrosa-4-fosfato en particular hacia la ruta del ácido shikímico, ya que tras el bloqueo por el glifosato de esta ruta, aumenta la demanda de intermediarios metabólicos a la misma. Según estos autores los efectos del glifosato dependen del nivel de reducción de los intermediarios del ciclo de Calvin y en particular de la RuBP y del 3-P-glicerato (Servaites *et al.*, 1987; Shieh *et al.*, 1991). Esto podría ocurrir también en nuestro caso, concluyendo que si el efecto del glifosato es sustraer carbohidratos de los intermediarios del ciclo de Calvin hacia la ruta del shikímico, se produciría un descenso de los niveles de RuBP y de los intermediarios de la cadena de transporte de electrones fotosintética, y consecuentemente el ciclo de Calvin perdería su operatividad, al no consumir el ATP y el poder reductor producido en la fase lumínica.

Sin embargo, la alteración más destacada fue la detección de dos nuevos polipéptidos en el citosol bacteroidal de 21 y 44 kDa, en los tratamientos con concentraciones de 5 y 10 mM de glifosato, que no se detectaban en los controles. En nuestro departamento otros nuevos polipéptidos también han sido detectados en el citosol vegetal de hojas en plantas tratadas con herbicidas (Fernández-Pascual *et al.*, 1988; 1992), pero éste es el primer polipéptido detectado en el citosol bacteroidal del nódulo. En el citosol vegetal de las hojas y del nódulo no se induce ninguna nueva proteína sino que más bien desciende el contenido de varios polipéptidos.

El descenso del metabolismo proteico como respuesta del lupino en simbiosis al glifosato, es común con otros estreses abióticos. Así la disminución en el contenido de proteína soluble es una respuesta general al estrés salino en numerosas leguminosas (Swaraj y Bishnoi, 1999). Este tipo de respuesta es coincidente con la obtenida por Hernández-Jiménez, 2002 en nódulos de lupino en tratamientos de senescencia natural e inducida. Además el crecimiento de las plantas de lupino en presencia de elevadas concentraciones de nitrato también produce un descenso de las proteínas solubles (Lang, 1990). Esta proteólisis puede ser una de las causas de la caída de las actividades enzimáticas en general y extensivamente de las proteínas. Teniendo en cuenta que si el glifosato bloquea la ruta de biosíntesis de los aminoácidos aromáticos, y en consecuencia las proteínas derivadas de éstos, el descenso del contenido de proteínas puede ser debido a esta limitación en la disponibilidad de aminoácidos aromáticos para la biosíntesis de proteínas.

### **9. Caracterización del polipéptido BLpp bacteroidal de 44 kDa**

Los estréses abióticos, extensamente estudiados, abarcan una gama amplia de condiciones ambientales que pueden alterar el metabolismo, crecimiento y desarrollo de la planta significativamente, llevando incluso a la necrosis celular. Estudios de expresión génica en estos estreses han puesto de manifiesto que mientras algunas respuestas génicas observadas son comunes, otras son específicos del estrés aplicado (Seki *et al.*, 2002). La síntesis de nuevas proteínas es una respuesta común a estos estreses teniendo lugar en diferentes compartimentos subcelulares. El glifosato, como estrés abiótico, en concentraciones de 5 y 10 mM, indujo la expresión de una proteína bacteroidal de 44 kDa, a partir de 4 días de tratamiento.

El análisis comparativo de la secuencia aminoacídica de la región N-terminal de dicho polipéptido, mostró que era idéntica a la correspondiente a una “posible porina” de *Bradyrhizobium japonicum*. Además presentaba una elevada identidad con las de otras proteínas descritas también como porinas –en base a análisis computacionales de sus secuencias- de *Rhodopseudomonas palustri* y *Mesorhizobium loti*, ambas especies con

una relación filogenética cercana al género *Bradyrhizobium* spp. según sus secuencias de genes 16S ARNr.

Con el fin de conocer la naturaleza y establecer la funcionalidad del polipéptido bacteroidal de 44 kDa se procedió a la identificación del gen codificador de la proteína. La obtención de cuatro clones del ADN genómico de *Bradyrhizobium* sp. (*Lupinus*) que completaron la secuencia de un gen, al que denominamos *blpp*, nos permitió establecer, en su análisis, que *blpp* constaba de 2.467 pb y codificaba una proteína de 506 aminoácidos, con una masa molecular calculada de 53 kDa; valor que está bien correlacionado con el de 44 kDa calculado a partir de la movilidad electroforética. La proteína la denominamos BLpp.

La proteína BLpp, con una identidad del 62,5% con Bjpp en su secuencia aminoacídica, también mostró homología con proteínas de otras especies bacterianas. En este caso la proteína que presentaba mayor identidad con BLpp fue la porina Omp2b de *Brucella suis* con un 29% de identidad. En la comparación de las secuencias nucleotídicas también se encontró una elevada identidad con los genes *omp2a* y *omp2b*, de diferentes especies del género *Brucella* (*B. abortus*, *B. canis*, *B. melitensis*, *B. neotomae*, *B. ovis* y *B. suis*). La homología encontrada entre *Brucella* spp. y *Bradyrhizobium* spp. no es sorprendente ya que hibridaciones de ARNrs y de ADNn han mostrado un origen filogenético estrecho de *Brucella* y del complejo de bacterias *Agrobacterium-Rhizobium* (de Ley *et al.*, 1987). Es más, la comparación de las secuencias de ARN ribosómico 16S y la composición lipídica de varias cepas bacterianas revela la estrecha relación entre *Brucellae*, *Rhizobiae*, *Agrobacteria*, y *Rickettsiae*, todas ellas incluidas en la subdivisión alfa-2 de la clase Proteobacteria. Estas bacterias se caracterizan por vivir en asociación estrecha como patógenos o como simbioses, con animales o células eucarióticas de plantas (Moreno *et al.*, 1990). Otros estudios son coincidentes en la relación genética existente entre los miembros de la alfa-2-Proteobacteria (Cloeckaert *et al.*, 1996; Vizcaino *et al.*, 1996).

En relación a las proteínas de membrana externa (OMPs) de *Brucella* spp., Paquet *et al.*, 2001 analiza los dominios estructurales de las proteínas Omp2a y Omp2b en el contexto de la familia de las porinas. En este estudio los genes que codifican dichas porinas, *omp2a* y *omp2b* en el genoma de *Brucella*, aunque orientados en dirección opuesta poseen un alto grado de identidad (>85%). La mayor divergencia observada en las secuencias entre ambas porinas son dos inserciones y deleciones localizadas en los loops L3 y L5 en el modelo topológico. Cambios en la permeabilidad al azúcar, han sido atribuidos a las modificaciones severas en el loop L5, lo que nos indica la importancia que tiene la constricción del L5 en la actividad del poro, a pesar del papel crucial del loop L3 descrito en la mayoría de las porinas (Jap *et al.*, 1996).

Las bacterias Gram negativas a través de la capa de peptidoglucano y de la membrana externa se protegen de la vulnerabilidad de su membrana citoplasmática. Ahora bien, la membrana externa no representa una barrera para la bacteria, ya que mediante la regulación de las porinas consiguen hacerla permeable, si bien la expresión y actividad de estas proteínas de membrana externa se verá afectada por las condiciones ambientales externas.

Las porinas a pesar de constituir un grupo muy amplio han sido descritas en general como proteínas de la membrana externa de bacterias Gram negativas (Delcour, 2002), a través de cuyos poros acuosos permiten la difusión no específica de solutos hidrofílicos e iones, además de la entrada selectiva de moléculas a través de porinas específicas. La abundancia de estas proteínas y su diversidad nos indicaría su importancia en el intercambio de la bacteria con el medio extracelular, al ser claves en la interacción de la membrana externa de la bacteria con el medioambiente, incluidas las plantas y animales (Nikaido *et al.*, 2003).

La existencia de un motivo típico de porinas próximo a la región N-terminal en nuestra proteína BLpp, nos permite afirmar la alta conservación existente de algunas regiones en esta superfamilia. El análisis filogenético de este motivo conservado nos definió varios agrupamientos, en los que BLpp compartió una mayor homología con las posibles porinas de *Bradyrhizobium japonicum* y la Omp2b de *Rhodopseudomonas palustri*, especies con una relación filogenética cercana (Sawada *et al.*, 2003).

Estudios recientes de análisis proteómico de membranas del simbiosoma aisladas de nódulos de leguminosas han indicado que las porinas VDAC también podrían estar involucradas en el transporte entre la planta y el rizobio (Saalbach *et al.*, 2002; Wienkoop y Saalbach, 2003). Esta localización es opuesta a la observación de Wandrey *et al.*, 2004, quienes en la caracterización molecular y celular de las proteínas VDAC en nódulos de *Lotus japonicum* y de soja no detectaron la presencia de VDAC en la membrana del simbiosoma aunque no se excluye la posibilidad de que en la identificación utilizada mediante inmunolocalización, el antígeno de VDAC reconocido por el anticuerpo LjVDAC sea de algún modo enmascarado y no detectado en la membrana del simbiosoma *in situ*. En el estudio proteómico de la membrana peribacteroidal también han sido clonadas y caracterizadas varios tipos de acuaporinas, además de la ATPasa de protones, el transportador de amonio y de ácidos dicarboxílicos, lo que podría ser indicativo de su importancia en el intercambio a través de la MPB (Wienkoop y Saalbach, 2003). Dean *et al.*, 1999 en nódulos de soja pusieron de manifiesto la multifuncionalidad de la acuaporina nodulina 26, con relación al transporte de agua y de glicerol, sugiriendo también su implicación en la osmoregulación. Si la membrana peribacteroidal juega un papel central en el intercambio simbiótico (Udvardi y Day, 1997), quizás la

sobreexpresión de la porina bacteroidal podría ser la respuesta a la inhibición en este intercambio de solutos entre los simbios.

Con la finalidad de establecer una posible relación entre la estructura y la función de la proteína se llevó a cabo el análisis de la secuencia de la proteína BLpp. Si la proteína BLpp fuera una proteína de membrana externa del rizobio como hemos descrito en base al análisis comparativo con las secuencias de mayor homología encontradas en las bases de datos, podrían encontrarse en esta proteína posibles dominios de transmembrana. En este sentido con el programa utilizado se predijo una región comprendida entre los aa 421-431 como un motivo de unión a lipoproteínas de membrana de procariotas. El hecho de que este tipo de sitio de unión haya sido descrito en la proteína BLpp nos podría indicar que se localiza en la membrana del *Bradyrhizobium*. Koebnik *et al.*, 2000 describen la estructura y función de las proteínas de membrana externa destacando las diferencias entre las dos membranas de bicapa lipídica que rodean a las bacterias Gram negativas. La composición de la membrana interna es exclusivamente de fosfolípidos, en cambio la membrana externa es muy asimétrica, en la cara interna muestra la misma composición que la membrana citoplasmática interna y en la cara externa la composición es de lipopolisacáridos, entre los que se integran las porinas. Con las técnicas de alta resolución estructural utilizadas desde hace relativamente pocos años, la estructura de las porinas resueltas experimentalmente han confirmado la predicción realizada por Rosenbusch, 1988 para las proteínas de membrana, en la que sólo los elementos de la estructura secundaria en hélices  $\alpha$  y lámina  $\beta$  podrían formar parte de la bicapa lipídica. En ésta, integrado, se encuentra el monómero de la porina constituido por elementos transmembrana de láminas  $\beta$  antiparalelas envueltos dentro de un barril (Koebnik *et al.*, 2000). La arquitectura  $\beta$ -barrel típica de porinas consta de 8 a 22 láminas  $\beta$ , que generalmente se interconectan con el espacio periplásmico con secuencias de giro corto y con la cara externa de la membrana a través de las secuencias de lazo largo (Hancock y Brinkman, 2002).

Además en esta predicción de la estructura secundaria de BLpp es de especial importancia la identificación de un posible dominio transmembrana  $\beta$ -barrel correspondiente a una porina específica de sacarosa (ScrY), descrita en proteínas de membrana externa de enterobacterias y perteneciente a la familia de las porinas, que coincidiría con la secuencia completa de BLpp.

El modelo de la estructura tridimensional de la porina específica de sacarosa (ScrY) procedente de *Salmonella typhimurium*, representado en la figura 50, fue determinado por Forst *et al.*, (1998) mediante cristalografía de rayos X, en éste se representa el monómero de porina, en el que el polipéptido plegado en 18 láminas antiparalelas de

estructura  $\beta$ -barrel, exhibe sus aminoácidos hidrofílicos en el hueco del poro, mientras en el exterior se exponen sus residuos hidrofóbicos. ScrY es un trímero de subunidades idénticas, cada una estructuralmente definida por 413 aa. Tres de estos monómeros se agrupan formando moléculas estables triméricas (Dumas *et al.*, 2000), como se visualiza en la imagen siguiente (fig. 51). Sin embargo, los 71 aa de la región N-terminal posteriormente determinados por Michels *et al.*, 2002, contienen un dominio periplásmico que muestra una influencia fuerte sobre la afinidad de la unión de oligosacaridos a la porina ScrY.

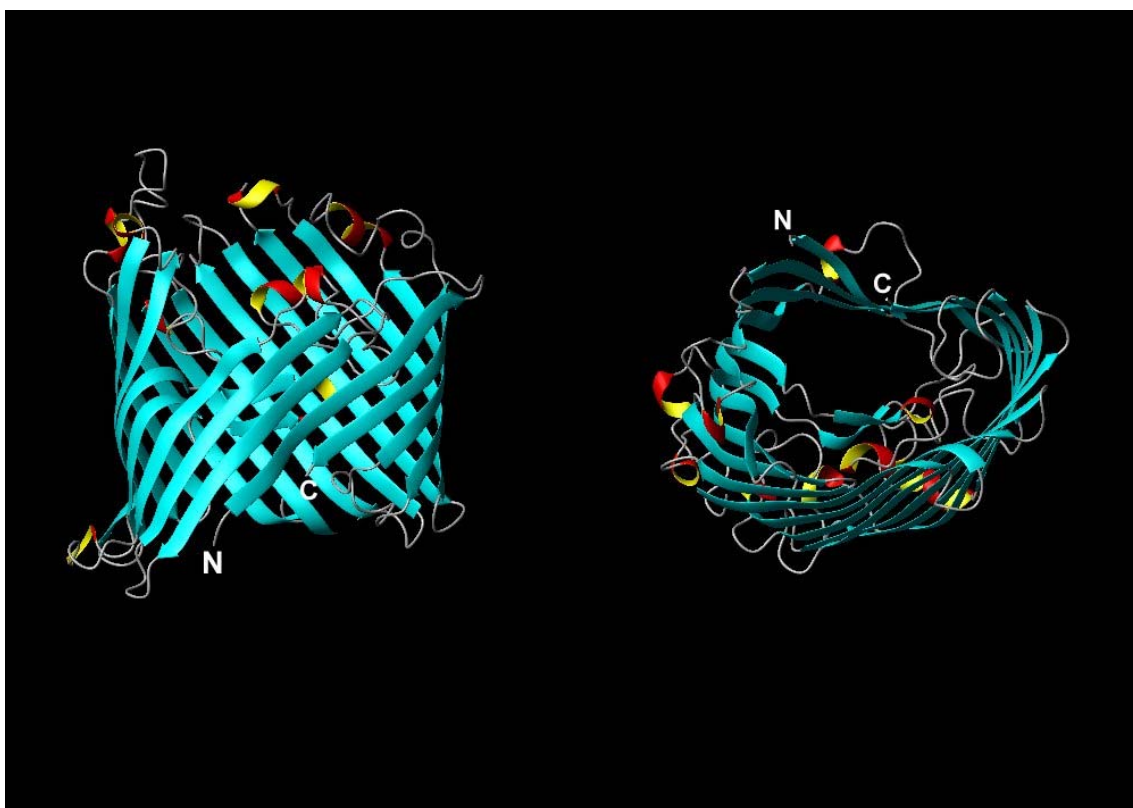


Figura 50: Vista de perfil (izquierda) y desde arriba (derecha) del dominio transmembrana  $\beta$ -barrel correspondiente a la cadena P de "sucrose-specific porin" de 1AOT. La proteína está representada por la estructura secundaria en: láminas- $\beta$  (en azul), hélice- $\alpha$  (en rojo y amarillo) y regiones "loop" (en gris), asimismo se señala la posición de los extremos N y C terminales en el modelo estructural tridimensional.

La topología entre LamB (malto porina) y ScrY (sacarosa porina) muestra una elevada similitud y su estudio comparativo ha permitido conocer la implicación en la funcionalidad de los cambios estructurales, además de las diferencias con otras porinas. Así, la altísima permeabilidad para la sacarosa de ScrY comparable a la de la maltosa se considera que es debida principalmente a diferencias en los residuos que revisten el poro (Forst *et al.*, 1998). La estructura LamB esencialmente lámina  $\beta$  está compuesta por 18



láminas, dos láminas adicionales con respecto a las 16 existentes en las porinas no específicas, éstas deben ser importantes para conferir selectividad para la maltosa y maltodextrina. En la estructura del poro la región de constricción es más estrecha que un poro de difusión general, además una serie de residuos de aminoácidos aromáticos se extiende en el vestíbulo exterior a través de la región de constricción y en la apertura del vestíbulo periplásmico (Meyer y Schulz, 1997). Schirmer *et al.*, 1995 ha postulado que estos residuos de aa aromáticos pueden ligar y alinear los sustratos de azúcar con el eje del poro y permitir su difusión guiada por la membrana.

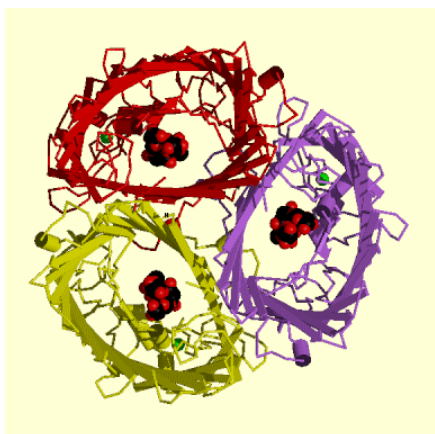


Figura 51: Modelo de estructura trimérica de 1AOT. Cada monómero se representa en un color (rojo, amarillo y violeta), formando la estructura trimérica. En el interior del poro se señala la entrada de los ligandos (en rojo y negro).

La predicción de la estructura secundaria de BLpp descrita es esencialmente lámina  $\beta$ , lo que se corresponde con la estructura secundaria de la familia de las porinas, así como con la secuencia resuelta experimentalmente 1AOT (ScrY), según la cual se realizó la predicción. Ambas se diferencian en el número de elementos  $\beta$  y  $\alpha$  de la estructura, de esta forma en BLpp encontramos tres únicos elementos hélice  $\alpha$  uno en el extremo N y los otros dos próximos al sitio de unión a membrana, cercanos al extremo C. Una mayoría de elementos  $\beta$ , en un 40% frente al 8% de elementos  $\alpha$ , en cambio en 1AOT existen 20 elementos  $\beta$  y 7 hélices  $\alpha$ . Por otro lado, los análisis de la estructura no permitieron obtener ningún modelo concluyente de la estructura tridimensional de la proteína BLpp. No obstante, en las predicciones estructurales puede darse sólo una idea de la topología de la proteína pero no datos relevantes estructuralmente que son necesarios para comprender el mecanismo de la función proteica (Koebnik *et al.*, 2000).

El análisis de los clones de ADN genómico que codifican una única secuencia nucleotídica y aminoacídica de la proteína BLpp, así como el patrón de bandas obtenido en los análisis *Southern* nos permiten concluir que esta proteína está codificada por un único gen (*blpp*) en el genoma bacteriano.

En el nódulo, aunque también hemos detectado expresión basal en ausencia del tratamiento y en concentraciones de glifosato bajas, la expresión de *blpp* es máxima en las más altas concentraciones del tratamiento, donde el daño celular y los efectos adversos observados son mayores. Como hemos apuntado anteriormente, en el nódulo de lupino, en donde las vacuolas mantienen la turgencia celular por la ausencia de células intersticiales, la integridad de las membranas del bacteroide juega un papel muy importante en el mantenimiento de la turgencia de la célula infectada. Como consecuencia de la desintegración o ruptura de la membrana del simbiosoma bajo el tratamiento abiótico del glifosato se producirían desajustes osmóticos e inhibición del transporte del bacteroide, limitando la disponibilidad de solutos. Cambios en la permeabilidad de la membrana coordinados con la acumulación y compartimentación de solutos compatibles pueden ser parte del ajuste osmótico (Bohnert *et al.*, 1995). La ruptura del intercambio metabólico y los altos niveles citosólicos de sacarosa observados, consecuencia del menor consumo, podrían ser los causantes de la sobreexpresión de la porina en aquellas células que mantienen intacto el intercambio celular, para así mantener o restablecer el transporte al interior bacteroidal, sin descartar la posibilidad de su implicación en el transporte de otras sustancias. Por lo tanto, BLpp en el bacteroide simbiótico podría tener un papel estratégico en la membrana bacteroidal controlando el intercambio de nutrientes entre la planta y el bacteroide en los nódulos de lupino.

Recientemente, Gu *et al.*, 2004 han detectado la activación de la expresión de una acuaporina entre otros transcritos en *Populus euphratica*, en condiciones de estrés salino. Por el contrario, Smart *et al.*, 2001 en estudios previos en plantas, han descrito un descenso drástico de los transcritos de los genes MIPs (proteínas intrínsecas de membrana) bajo condiciones de estrés hídrico. Esta disminución como consecuencia de la pérdida de permeabilidad al agua de la membrana, favorecería la conservación del agua en periodos de deshidratación, lo que nos indica que diferentes cambios en la expresión génica deben representar parte de la respuesta adaptativa de la planta al estrés abiótico. No obstante, Guenther *et al.*, 2003 no han detectado variaciones en la expresión de la acuaporina, nodulina 26, en nódulos de soja bajo estrés osmótico, si bien se ha detectado activación de la fosforilación de la porina.

Nuestros resultados ponen de manifiesto que el herbicida o las alteraciones metabólicas que sufre la planta como consecuencia del tratamiento, modifican la expresión del gen de BLpp. Esta sobreexpresión del gen es consecuencia de una regulación a nivel transcripcional en el nódulo simbiótico y forma parte de la adaptación del nódulo al estrés del herbicida.

En la bacteria crecida en vida libre sólo existe una expresión constitutiva basal del *blpp* en ausencia del tratamiento, mientras que el tratamiento inhibe la expresión. Por el

contrario, la expresión de la acuaporina *aqp X* de *Brucella abortus*, se induce en condiciones de hiperosmolaridad (Hernández-Castro *et al.*, 2003).

El hecho de que la expresión del gen del rizobio crecido en vida libre sea diferente a la expresión en el nódulo, nos permite concluir que el mismo estrés abiótico induce respuestas distintas en el patrón de expresión del gen *blpp* bacteriano cuando el rizobio esta en vida libre o en simbiosis. En la interacción de ambos simbioses, se producen cambios en sus metabolismos respectivos, lo que origina cambios en la expresión génica entre los dos estados: simbiótico y no simbiótico (Natera *et al.*, 2000). Uno de los cambios que se produce en el metabolismo de *Rhizobium* entre células cultivadas y los bacteroides son los cambios procedentes del metabolismo de los ácidos dicarboxílicos y el cambio de asimilación de amonio a secreción de éste. Así, los transportadores de amonio expresados en células cultivadas son requeridos para capturar nitrógeno pero son reprimidos en el bacteroide (Udvardi y Day, 1997).

Estudios de análisis proteómico han descrito una expresión diferencial durante la interacción entre la bacteria *Sinorhizobium meliloti* y la leguminosa *Melilotus alba*, identificando más de 250 proteínas activadas en el nódulo comparadas con la raíz y más de 350 inhibidas en la forma bacteroidal del rizobio comparada con el cultivo celular (Natera *et al.*, 2000). Aunque no se conocen con exactitud los mecanismos implicados en la represión o activación de los genes en el bacteroide en el establecimiento de la simbiosis, hay muchos estudios que han descritos estos cambios en la expresión en la bacteria no diferenciada y en los bacteroides maduros en el nódulo (de Maagd *et al.*, 1989; de Maagd *et al.*, 1992; Yeoman *et al.*, 2000).

Estas diferencias en la expresión posiblemente juegan un papel en la respuesta adaptativa del nódulo cuando tienen lugar bajo estrés abiótico. Así Girad *et al.*, 1996 en un estudio del patrón de transcripción de *pSym* de *Rhizobium etli*, encontraron que durante la simbiosis la mayoría de los genes en el plásmido simbiótico fueron inducidos. Incluso cuando las condiciones fueron limitantes, con bajas concentraciones de oxígeno y escasez de carbono y nitrógeno también conducían a la expresión génica para *pSym*.

Por otra parte, la regulación de la expresión de las porinas puede ocurrir en respuesta a compuestos químicos en el medio. Así se observó que el salicilato en el medio disminuye la síntesis de la porina OmpF en *Escherichia coli* (Rosner *et al.*, 1991). La síntesis también se reprime a altas temperaturas y en un medio de elevada presión osmótica. Sin embargo, las diferencias en la regulación según el tipo de porinas hacen que los resultados documentados sean controvertidos. Death *et al.*, 1993 han observado que en porinas específicas de pequeñas moléculas nutritivas como la maltoporina, expresadas en bacterias Gram negativas, el estrés nutritivo no inhibe la expresión. De esta forma aún con concentraciones de disacáridos más bajas que ~100  $\mu$ M se expresa.

En cambio, en diferentes estudios sobre acuaporinas se constata que la actividad de éstas son afectadas por fosforilación, pH, presión osmótica, salinidad, metales pesados o estrés oxidativo (Gerbeau *et al.*, 2002; Azaizeh *et al.*, 1992; Zhang y Tyerman, 1999; Henzler *et al.*, 1999).

Por consiguiente, teniendo en cuenta la variación de las propiedades químicas del medio al añadirle el glifosato (N-fosfometil glicina) y la masiva producción de intermediarios (ácido shikímico y ácido hidroxibenzoico) que son liberados al medio y que tienen efectos tóxicos (Moorman *et al.*, 1992), la bacteria podría responder adaptativamente para protegerse frente a la toxicidad del medio reprimiendo la expresión de la proteína implicada en el intercambio con el exterior alterado, siendo la expresión diferencial del gen *blpp* una respuesta adaptativa al estrés.

Finalmente, aún quedan numerosos aspectos sin conocer sobre la estructura y función de la proteína BLpp bacteriana, puesto que podría ser la primera porina de *Bradyrhizobium* sp. (*Lupinus*) encontrada, las futuras investigaciones que se desarrollen irán encaminadas al esclarecimiento y conocimiento de estos aspectos.



*CONCLUSIONES*







1. El glifosato afecta drásticamente a la fijación simbiótica de nitrógeno en plantas de *Lupinus albus* cv. Multolupa. El descenso de la actividad nitrogenasa se debe a la inhibición de procesos fisiológicos en el citosol del nódulo y no a un efecto directo sobre la propia enzima.
2. La barrera de resistencia a la difusión de oxígeno no se ve afectada cuando el nódulo de lupino se somete a un estrés con el herbicida glifosato, inversamente a lo que ocurre con otros estreses abióticos.
3. La aplicación de glifosato produce cambios en el metabolismo de carbono del nódulo. El descenso del contenido de almidón, paralelamente al de la enzima SS, y el aumento de sacarosa se relacionan con la alteración por el glifosato de la ruta de biosíntesis de aa aromáticos. Las variaciones en las actividades enzimáticas PEPc, MDH y AST dependen del tiempo de exposición al tratamiento y son consecuencia del déficit de sustratos carbonados necesarios para que tengan lugar estas reacciones enzimáticas.
4. El glifosato inhibe el crecimiento de *Bradyrhizobium* sp. (*Lupinus*) en vida libre, observándose una mayor tolerancia al tratamiento por parte de la planta que por parte del microsimbionte.
5. El tratamiento con glifosato produce cambios progresivos y diferenciales en la ultraestructura del nódulo y del aparato fotosintético. Entre las alteraciones ultraestructurales observadas en el nódulo, destacan la ruptura de la membrana bacteroidal a partir de concentraciones intermedias y la elevada densidad electrónica del citoplasma por la intensa actividad lítica. En el cloroplasto, aparece una desorganización del sistema lamelar con pérdida de la orientación paralela al eje del cloroplasto. Además, se observa un incremento de glóbulos lipídicos y plastoglóbulos debido a la pérdida lipídica sufrida por el sistema grana-intergrana.
6. El tratamiento con glifosato ha puesto de manifiesto una correlación directa entre la acumulación de compuestos fenólicos y el descenso de la actividad nitrogenasa, ya que las concentraciones del ácido shikímico y protocatéquico aumentan en los nódulos y hojas de *Lupinus* rápidamente después de la aplicación de glifosato. Las hojas en formación presentan mayor acumulación de compuestos fenólicos que las hojas maduras y nódulos.

7. Las condiciones simbióticas proporcionan una mayor defensa frente al glifosato en comparación con el aporte de nitrato en plantas de *Lupinus*, puesto que la acumulación de intermediarios fenólicos es menor en plantas noduladas que en plantas tratadas con nitrato.
8. La detección de un nuevo polipéptido de 44 kDa en el patrón proteico del citosol bacteroidal ha sido la alteración más destacada producida por el glifosato en el metabolismo de proteínas. Esta proteína (BLpp) está codificada por un único gen en el genoma bacteriano.
9. Estudios de la expresión génica de la proteína BLpp indican que los niveles de expresión del gen *blpp* aumentan en los nódulos a medida que aumenta la concentración de glifosato, lo que indica una regulación transcripcional del gen. En la bacteria en vida libre, se ha detectado acumulación de ARN sólo en ausencia de glifosato, lo que indica diferencias en su patrón de expresión en vida libre y en simbiosis.
10. El análisis de las secuencias nucleotídicas y aminoacídicas deducidas de la proteína BLpp, así como su estructura secundaria y el posible dominio transmembrana  $\beta$ -barrel perteneciente a la familia de las porinas, sugiere que la proteína BLpp es una “posible” porina. Esta sería la primera porina descrita en la bacteria *Bradyrhizobium* sp. (*Lupinus*).



## *BIBLIOGRAFÍA*





- Abd-Alla, M.H., Omar, S.A. y Karanxha, S.** (2000). The impact of pesticides on arbuscular mycorrhizal and nitrogen-fixing symbioses in legumes. *Applied Soil Ecology* **14**: 191-200.
- Agre, P., Bonhivers, M. y Borgnia, M.J.** (1998). The aquaporins, blueprints for cellular plumbing systems. *Journal of Biological Chemistry* **273**: 14659-14662.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. y Lipman, D.J.** (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* **215**: 403-410.
- Amor, Y., Haigler, C.H., Johnson, S., Wainscott, M., y Delmer, D.P.** (1995). A membrane-associated form of sucrose synthase and its potential role in synthesis of cellulose and callose in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences, U.S.A.* **92**: 9353-9357.
- Amrhein, N., Deus, B., Gehrke, P. y Steinrücken, H.C.** (1980). The site of the inhibition of the shikimate pathway by glyphosate. *Plant Physiology* **66**: 830-834.
- Anderson, R.L.** (1985). Environmental effects of metsulfuron and chlorsulfuron bioactivity in soils. *Journal of Environmental Quality* **14**: 517-521.
- Anguenot, R., Yelle, S. y Nguyen-Quoc, B.** (1999). Purification of tomato sucrose synthase phosphorylated isoforms by Fe(III)-immobilized metal affinity chromatography. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **365**: 163-169.
- Araújo, A.S.F., Monteiro, R.T.R. y Abarkeli, R.B.** (2003). Effect of glyphosate on the microbial activity of two Brazilian soils. *Chemosphere* **52**: 799-804.
- Arrese-Igor, C., González, E.M., Gordon, A.J., Gálvez, L., Royuela, M., Cabrerizo, P.M. y Aparicio-Tejo, P.M.** (1999). Sucrose synthase and nodule nitrogen fixation under drought and other environment stresses. *Symbiosis* **27**: 189-212.
- Asano, T., Kunieda, N., Omura, Y., Ibe, H., Kawasaki, T., Takano, M., Sato, M., Furuhashi, H., Mujin, T., Takaiwa, F. Wu Cy, C.Y., Tada, Y., Satozawa, T., Sakamoto, M. y Shimada, H.** (2002). Rice SPK, a calmodulin like domain protein kinase, is required for storage product accumulation during seed development: Phosphorylation of sucrose synthase is a possible factor. *Plant Cell* **14**: 619-628.
- Azaizah, H., Gunse, B. y Steudle, E.** (1992). Effects of NaCl and CaCl<sub>2</sub> on water transport across root cells of maize (*Zea mays* L.) seedlings. *Plant Physiology* **99**: 886-894.
- Baerson, S.R., Rodríguez, D.J., Tran, M., Feng, Y., Biest, N.A. y Dill, G.M.** (2002). Glyphosate-resistant goosegrass. Identification of a mutation in the target enzyme 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase. *Plant Physiology* **129**: 1265-1275.
- Barratt, D.H.P., Barber, L., Kruger, N.J., Smith, A.M., Wang, T.L., Martin, C.** (2001). Multiple, distinct isoforms of sucrose synthase in pea. *Plant Physiology* **127**: 655-664.
- Barry, G., Kishore, G. Padgett, S. Taylor, M. Kolacz, K., Weldon, M., Re, D., Eichholtz, D., Fincher, K. y Halla, L.** (1992). Inhibitors of amino acid biosynthesis: Strategies for imparting glyphosate tolerance to crop plants. En *Biosynthesis and Molecular Regulation of Amino Acids in Plants*. Singh, B.K., Flores, H., Shannon, J.C. Eds. American Society of Plant Physiologist. Rockville. M.D. pp. 139-145.
- Bergey** (2000). Bergey's Manual of determinative bacteriology. Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath, P.H.A., Staley, P.H.A. y Williams, S.T. Eds. Williams & Wilkins. Philadelphia. USA.
- Bethlenfalvay, G.J., Norris, R.F. y Phillips, D.A.** (1979). Effect of bentazon, a Hill reaction inhibitor, on symbiotic nitrogen-fixing capability and apparent photosynthesis. *Plant Physiology* **63**: 213-215.

- Becana, M. y Rodríguez-Barrueco, C.** (1989). Protective mechanism of nitrogenase against oxygen excess and partially-reduced oxygen intermediates. *Physiologia Plantarum* **75**: 429-438.
- Becana, M. y Sprent, J.I.** (1989). Effect of nitrate on components of nodule leghemoglobins. *Journal of Experimental Botany* **40**: 725-731.
- Becana, M.** (1995). Hemoglobinas vegetales. *Investigación y Ciencia* **221**: 16-23.
- Becerril, J.M., Duke S.O. y Lydon, J.** (1989). Glyphosate effect on shikimate pathway products in leaves and flowers of velvetleaf. *Phytochemistry* **28**: 695-699.
- Benz, R.** (1994). Permeation of hydrophilic solutes through mitochondrial outer membranes: review on mitochondrial porins. *Biochimica et Biophysica Acta* **1197**: 167-196.
- Bergersen, F.J.** (1982). Anatomy and structure of nodules. En *Root Nodules of Legumes: Structure and Functions*. Research Studies Press. Eds. John and Wiley sons Ltd., Chichester, pp. 23-50.
- Bohnert, H.J., Nelson, D.E. y Jensen, R.G.** (1995). Adaptations to environmental stresses. *Plant Cell* **7**: 1099-1111.
- Bollich, P.K., Dunigan, E.P., Kitchen, L.M. y Taylor, V.** (1988). The influence of trifluralin and pendimethalin on nodulation  $N_2$  ( $C_2H_2$ ) fixation, and seed yield of field-grown soybeans (*Glycine max.*). *Weed Science* **36**: 15-19.
- Bolter, B. y Soll, J.** (2001). Ion channels in the outer membranes of chloroplasts and mitochondria: open doors or regulated gates?. *The EMBO Journal* **20**: 935-940.
- Borchert, S., Harborth, J., Schunemann, D., Hoferichter, P. y Heldt, H.W.** (1993). Studies of the enzymic capacities and transport properties of pea root plastids. *Plant Physiology* **101**: 303-312.
- Bowman, E.S. e Ikuma, H.** (1976). Regulation of malate oxidation in isolated mung bean mitochondria. II Role of adenylates. *Plant Physiology* **58**: 438-446.
- Bradford, M.M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**, 248-254.
- Bradshaw, L.D., Padgett, S.R., Kimball, S.L. y Wells, B.H.** (1997). Perspectives on glyphosate resistance. *Weed Technology* **72**: 189-198.
- Braud, S., Vaultier M.N., y Rochat C.** (2004). Structure and expression profile of the sucrose synthase multigene family in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany*. **55**:397-409.
- Bresnahan, G.A., Manthey, F.A., Howatt, K.A. y Chakraborty, M.** (2003). Glyphosate applied preharvest induces shikimic acid accumulation in hard red spring wheat (*Triticum aestivum*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **51**: 4004-4007.
- Bryan, J.K.** (1980). Synthesis of the aspartate family and branched-chain amino acids. En Mifflin, B.J. Eds. The biochemistry of plants: a comprehensive treatise, vol. 5. New York. Academic Press, pp. 403-452.
- Busse, M.D., Ratcliff, A.W., Shestak, C.J. y Powers, R.F.** (2001). Glyphosate toxicity and the effects of long-term vegetation control on soil microbial communities. *Soil Biology and Biochemistry* **33**: 1777-1789.
- Cabrerizo, P.M., González, E.M., Aparicio-Tejo, P.M. y Arrese-Agor, C.** (2001). Continuous  $CO_2$  enrichment leads to increased nodule biomass, carbon availability to nodules and activity of carbon-



- metabolising enzymes but does not enhance specific nitrogen fixation in pea. *Physiologia Plantarum* **113**: 33-40.
- Cañal, M.J., Tames, R.S. y Fernández, B.** (1987). Effect of glyphosate on phenolic metabolism in yellow nutsedge leaves. *Physiologia Plantarum* **69**: 627-632.
- Cárdenas, L., Feijo, J.A., Kunkel, J.G., Sánchez, F., Holdaway-Clarke, T., Hepler, P.K. y Quinto, C.** (1999). *Rhizobium* Nod factors induce increases in intracellular free calcium and extracellular calcium influxes in bean root hairs. *The Plant Journal* **19**: 347-352.
- Cardina, J., Hartwig, N.L. y Lukezic, F.L.** (1986). Herbicidal effects on crownvetch *Rhizobia* and nodule activity. *Weed Science* **34**: 338-343.
- Carlisle, S.M. y Trevors, J.T.** (1986). Effects of the herbicide glyphosate on respiration and hydrogen consumption in soil. *Water, Air, and Soil Pollution* **27**: 391-401.
- Carpena, R.O., Peñalosa, J., Esteban, E., Gárate, A., López, S., Vázquez, S., Zornoza, P.** (2001). Effects of As and Cd on *Lupinus albus* L. potential use in phytoremediation. En Phytoremediation of trace elements in contaminated soils and waters (with special emphasis on Zn, Cd, Pb and As). Cost Action 837 WG2 Workshop. pp.55-57.
- Carpena, R.O., Vázquez, S., Esteban, E., Fernández-Pascual, M., de Felipe, M.R. y Zornoza, P.** (2003). Cadmium-stress in white lupin: effects on nodule structure and functioning. *Plant Physiology and Biochemistry* **41**: 911-919.
- Chakrabarti, S. y Chatarpaul, L.** (1990a). Non-target effect of herbicides: I Effect of glyphosate and hexazinone on soil microbial activity. Microbial population, and *in vitro* growth of ectomycorrhizal fungi. *Pesticide. Science.* **28**: 233-241.
- Chakrabarti, S. y Chatarpaul, L.** (1990b). Non-target effect of herbicides: II The influence of glyphosate on ectomycorrhizal symbiosis of red pine (*Pinus resinosa*) under greenhouse and field conditions. *Pesticide. Science.* **28**: 243-247.
- Champigny, M.L. y Foyer, C.H.** (1992). Nitrate activation of cytosolic protein kinases diverts photosynthetic carbon from sucrose to amino acid biosynthesis: basic for a new concept. *Plant Physiology* **100**:7-12.
- Chinnasamy, G. y Bal, A.K.** (2003). Seasonal changes in carbohydrates of perennial root nodules of beach pea. *Journal of Plant Physiology* **160**:1185-1192.
- Chollet, R., Li, B., Zhang, X-Q.; Duff, S.M.G. y Wang, Y.H.** (1995). Regulatory phosphorylation of non-photosynthetic PEPC. Studies with C<sub>3</sub> leaves and N<sub>2</sub>-fixing root nodules. En: Satellite Meeting: Cellular Environment and Regulation of PEP-Carboxylase. En: International Congress Photosynthesis.
- Chollet, R., Vidal, J. y Oleary, M.H.** (1996). Phosphoenolpyruvate carboxylase: a ubiquitous, highly regulated enzyme in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **47**: 273-298.
- Chrispeels, M.J. y Maurel, C.** (1994). Aquaporins: the molecular basis of facilitated water movement through living plant cells. *Plant Physiology* **105**: 9-15.
- Christy, S.L., Karlander, E.P. y Parochetti, J.V.** (1981). Effects of glyphosate on the growth rate of *Chlorella*. *Weed Science* **29**: 5-7.
- Clark, S.A. y Mahanty, H.K.** (1991). Influence of herbicides on growth and nodulation of white clover *Trifolium repens*. *Soil Biology and Biochemistry* **23**: 725-730.

- Cloeckaert, A., Verger, J.M., Grayon, M. y Vizcaino, N.** (1996). Molecular and immunological characterization of the major outer membrane proteins of *Brucella*. *FEMS Microbiology Letters* **145**:1-8.
- Cole, D.J.** (1985). Mode of action of glyphosate a literature analysis. En *The Herbicide Glyphosate*. Eds. Grossbard, E. y Atkinson, D. Butterworth. Boston. Unites States. pp.48-74.
- Corby, H.D.L., Polhill, R.M. y Sprent, J.I.** (1983). Taxonomy. En *Nitrogen Fixation*, Vol. 3: Legumes. Ed. Broughton, W.J. Oxford University Press, pp. 1-35.
- Coursol, S., Giglioli-Guivarc'h, N., Vidal, J. y Pierre, J-N.** (1996). An increase in phosphoinositide-specific phospholipase C activity precedes induction of C<sub>4</sub> phosphoenolpyruvate carboxylase phosphorylation in illuminated and NH<sub>4</sub>Cl-treated protoplasts from *Digitaria sanguinalis*. *The Plant Journal* **23**: 497-506.
- Cullimore, J.V., Ranjeva, R. y Bono, J.J.** (2001). Perception of lipo-chitooligosaccharidic Nod factors in legumes. *Trends in Plant Science* **6**: 24-31.
- Cvitanich, C., Pallisgaard, N., Nielsen, K.A., Hansen, A.C., Larsen, K., Pihakaski-Maunsbach, K., Marcker, K.A. y Jensen, E.O.** (2000). CPP1, a DNA-binding protein involved in the expression of a soybean leghemoglobin c3 gene. *Plant Biology* **97**: 8163-8168.
- de Faria, S.M., Lewis, G.P., Sprent, J.I. y Sutherland, J.M.** (1989). Occurrence of nodulation in the Leguminosae. *New Phytologist* **121**: 607-619.
- de Felipe, M.R., Pozuelo, J.M., Lucas, M.M. y Fernández del Campo, F.** (1986). The effect of isoproturon on root growth and ultrastructure of the photosynthetic apparatus of two wheat cultivars and a weed. *Physiologia Plantarum* **66**: 563-568.
- de Felipe, M.R.; Fernández-Pascual, M.M., y Pozuelo, J.M.** (1987). Effects of herbicides Lindex and simazine on chloroplasts and nodule development, nodule activity and grain yield in *Lupinus albus* L. cv. Multolupa. *Planta and Soil* **101**: 99-105.
- de Felipe, M.R., Golvano, M.P., Lucas, M.M., Lang, P. y Pozuelo, J.M.** (1988). Differential effects of isoproturon on the photosynthetic apparatus and yield of two varieties of wheat and *L. rigidum*. *Weed Research* **28**: 85-92.
- de Felipe, M.R., Lucas, M.M., Lechaire, J.P., Nicolas, G., Fernández-Pascual, M.M. y Pozuelo, J.M.** (1997). Comparative study of two cryotechniques to elucidate real functional aspects of legume nodule development. *Journal of Plant Physiology* **150**: 428-436.
- de Felipe, M.R.** (2002). Biotecnologías limpias en agricultura. En: La salud, prioridad en el VI programa de medioambiente de la Unión Europea. Eds: Real Academia Nacional de Farmacia. pp. 257-278.
- de Ley, J., Mannheim, W., Segers, P., Lievens, A., Denijn, N., Vanhoucke, N. y Gillis, N.** (1987). Ribosomal ribonucleic acid cistron similarities and taxonomic neighborhood of *Brucella* and CDC group Vd. *International Journal of Systematic Bacteriology* **37**: 35-42.
- de Lorenzo, C., Lucas, M.M., Vivo, A. y de Felipe, M.R.** (1990). Effect of nitrate on peroxisome ultrastructure and catalase activity in lupin nodules (*Lupinus albus* L. cv Multolupa). *Journal of Experimental Botany* **41**: 1573-1578.
- de Lorenzo, C.** (1992). Efecto del nitrato sobre la barrera de resistencia a la difusión de oxígeno y sobre el metabolismo de especies tóxicas de oxígeno en nódulos de lupino. Tesis Doctoral. Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos. Universidad Politécnica de Madrid.

- de Lorenzo, C., Iannetta, P.P.M., Fernández-Pascual, M.M., James, E.K., Lucas, M.M., Sprent, J.I., Witty, J.F., Minchin, F.R. y de Felipe, M.R.** (1993). Oxygen diffusion in lupin nodules. II Mechanisms of diffusion barrier operation. *Journal of Experimental Botany* **44**: 1469-1474.
- de Maagd, R.A., Rijk, R., Mulders, I.H. y Lugtenberg, B.J.** (1989). Immunological characterization of *Rhizobium leguminosarum* outer membrane antigens by use of polyclonal and monoclonal antibodies. *Journal of Bacteriology* **171**: 1136-1142.
- de Maagd, R.A., Mulders, I.H., Canter Cremers, H.C. y Lugtenberg, B.J.** (1992). Cloning, nucleotide sequencing, and expression in *Escherichia coli* of a *Rhizobium leguminosarum* gene encoding a symbiotically repressed outer membrane protein. *Journal of Bacteriology* **174**: 214-221.
- de Rosa, F., Haber, D., Williams, C. y Margulis, L.** (1978). Inhibitory effect of the herbicide trifluralin on the establishment of the clover root nodule symbiosis. *Cytobios* **21**: 37-43.
- Dean, R.M., Rivers, R.L., Zeidel, M.L. y Robert, D.M.** (1999). Purification and functional reconstitution of soybean nodulin 26. An aquaporin with water and glycerol transport properties. *Biochemistry* **38**: 347-353.
- Death, A., Notley, L. y Ferenci, T.** (1993). Derepression of LamB protein facilitates outer membrane permeation of carbohydrates into *Escherichia coli* under conditions of nutrient stress. *Journal of Bacteriology* **175**: 1475-1483.
- Déjardin, A., Sokolov, L.N. y Kleczkowski, L.A.** (1998). An *Arabidopsis* stress-responsive sucrose synthase gene is up-regulated by low water potential. En: *Photosynthesis: Mechanisms and Effects*, Garab G., Eds., Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 2549-2552.
- Delcour, A.H.** (2002). Structure and function of pore-forming beta-barrels from bacteria. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* **4**: 1-10.
- Delgado, M.J., Drevon, J.J. y Bedman E.J.** (1992). Denitrification by bacteroids of an uptake hydrogenase negative Hup<sup>-</sup> and its isogenic Hup<sup>+</sup> parental strain of *Bradyrhizobium japonicum*. *FEMS Microbiology letters* **77**: 157-162.
- Delgado, M.J., Garrido, J.M., Ligerio, F. y Lluch, C.** (1993). Nitrogen fixation and carbon metabolism by nodules and bacteroids of pea plants under sodium chloride stress. *Physiologia Plantarum* **89**: 824-829.
- Devine, M.D., Duke, S.O. y Fedtke, C.** (1993). *Physiology of Herbicide Action*. PTR Prentice Hall, Inc. New Jersey. U.S.A.
- Dewick, P.M.** (1998). The biosynthesis of shikimate metabolites. *Natural Product Reports* **15**: 17-58.
- Djordjevic, S.P., Chen, H., Batley, M., Redmond, J.W. y Rolfe, B.G.** (1987). Nitrogen fixation ability of exopolysaccharide synthesis mutants of *Rhizobium* sp. strain NGR234 and *Rhizobium trifolii* is restored by the addition of homologous exopolysaccharides. *Journal of Bacteriology* **169**: 53-60.
- Dordas, C., Rivoal, J. y Hill, R.D.** (2003). Plant hemoglobins, nitric oxide and hypoxic stress. *Annals of Botany*. **91**:173-178.
- Doyle, J.J. y Luckow, M.A.** (2003). The rest of iceberg. Legume diversity and evolution in a phylogenetic context. *Plant Physiology* **131**: 900-910.
- Duke, S.O.** (1988). Glyphosate. En *Herbicide. chemistry, degradation and mode of action*. Eds. Kearney, P.C. y Kaufman, D.D.. Marcel Dekker, Inc. New York. U.S.A.. Vol. **3**: 1-70.
- Dumas, F., Frank, S., Koebnik, R., Maillet, E., Lustif, A. y Van Gelder, P.** (2000). Extended sugar slide function for the periplasmic coiled coil domain of ScrY. *Journal of Molecular Biology* **300**: 687-695.

- Dyer, W.E.** (1994). Resistance to glyphosate. En: *Herbicide resistance in plants: biology and Biochemistry*. Eds. Powles, S. y Holtum, J. Lewis Publisher. CRC Press, Inc.
- Endre, G., Kereszt, A., Kevei, Z., Mihacea, S., Kaló, P. y Kiss, G.B.** (2002). A receptor kinase gene regulating symbiotic nodule development. *Nature* **417**: 962-966.
- Escudero, P.R., Minchin, F.R., Gorgorcena, Y., Iturbe-Ormaetxe, I., Klucas, R.V. y Becana, M.** (1996). Involvement of activated oxygen in nitrate-induced senescence of pea root nodules. *Plant Physiology* **110**:1187-1195.
- Etzler, M.E., Kalsi, G., Ewing, N.N., Roberts, N.J., Day, R.B. y Murphy, J.B.** (1999). A nod factor binding lectin with apyrase activity from legume roots. *Proceedings of the National Academy of Science, U.S.A.* **96**: 5856-5861.
- Farnham, M.W., Miller, S.S., Griffith, S.M. y Vance, C.P.** (1990). Aspartate aminotransferase in alfalfa root nodules. II. Immunological distinction between two forms of the enzyme. *Plant Physiology* **93**: 603-610.
- Fedorova, M., van de Mortel, J., Matsumoto, P.A., Cho, J., Town, C.D., VandenBosch, K.A., Gantt, J.S. y Vance, C.P.** (2002). Genome-wide identification of nodule-specific transcripts in the model legume *Medicago truncatula*. *Plant Physiology* **130**: 519-537.
- Felle, H.H., Kondorosi, E., Kondorosi, A. y Schultze, M.** (1998). The role of ion fluxes in Nod factor signalling in *Medicago sativa*. *The Plant Journal* **13**: 455-463.
- Fernández-Pascual, M.M., Pozuelo, J.M., Serra, M.T. y de Felipe, M.R.** (1988). Effects of cyanazine and linuron on chloroplast development, nodule activity and protein metabolism in *Lupinus albus* L. *Journal of Plant Physiology* **133**: 288-294.
- Fernández-Pascual, M.M., de Lorenzo, Pozuelo, J.M. y de Felipe, M.R.** (1992). Alteration induced by four herbicides on lupine nodule cortex structure, protein metabolism and some senescence-relates enzymes. *Journal of Plant Physiology* **140**: 385-390.
- Fernández-Pascual, M.M., de Lorenzo, C., Sixto, H., Pozuelo, J.M., Guasch, L. y de Felipe, M.R.** (1996). Photosynthetic and nitrogenase activities in *Lupinus albus* plants treated with herbicides from different chemical groups. En Proceedings of the International Symposium on Weed and Crop Resistance to Herbicides. pp. 134-136. Eds. R. de Prado, J. Jorin, L. García Torres, G. Marshall. Universidad de Córdoba, Córdoba.
- Fernández-Pascual, M., de Lorenzo, C., de Felipe, M.R., Rajalakshmi, S., Gordon, A.J., Thomas, B.J. y Minchin, F.R.** (1996). Possible reasons for relative salt stress tolerance in nodules of white lupin cv. Multolupa. *Journal of Experimental Botany* **47**: 1709-1716.
- Fernández-Pascual, M., de María, N., y de Felipe, M.R.** (2002). Fijación biológica de nitrógeno: factores limitantes. Ciencia y Medioambiente. Eds: F. Valladares. CCMA. CSIC.195-202.
- Fondy, B.R., Geiger, D.R. y Servaites, J.C.** (1989). Photosynthesis, carbohydrate metabolism, and export in *Beta vulgaris* L. and *Phaseolus vulgaris* L. during square and sinusoidal light regimes. *Plant Physiology* **89**: 396-402.
- Forrest, S.I., Verma, D.P.S. y Dhuindsa, R.S.** (1991). Starch content and the activities of starch mobilizing enzymes in effective and ineffective root nodules of soybean. *Canadian Journal of Botany*. **69**:697-701.

- Forlani, G., Mangiacalli, A., Nielsen, E. y Suardi, C.M.** (1999). Degradation of the phosphonate herbicide glyphosate in soil: evidence for a possible involvement of unculturable microorganism. *Soil Biology and Biochemistry* **31**: 991-997.
- Forst, D., Welte, W., Wacker, T., Diederichs, K.** (1998). Structure of the sucrose-specific porin ScrY from *Salmonella typhimurium* and its complex with sucrose. *Nature structural biology* **5**: 37.
- Fortin, M.G., Morrison, N.A. y Verma, D.P.S.** (1987). Nodulin-26, a peribacteroid membrane nodulin is expressed independently of the development of the peribacteroid compartment. *Nucleic Acids Research* **15**: 813-824.
- Foyer, C., Valadier, M.H., Migge, A., Becker, T.W.** (1998). Drought-induced effects on nitrate reductase activity and mRNA and on the coordination of nitrogen and carbon metabolism in maize leaves. *Plant Physiology* **117**: 283-292.
- Frayse, N., Couderc, F. y Poinso, V.** (2003). Surface polysaccharide involvement in establishing the *Rhizobium*-legume symbiosis. *European Journal of Biochemistry* **270**: 1365-1380.
- Gage, D.J., Bobo, T. y Long, S.R.** (1996). Use of green fluorescent protein to visualize the early events of symbiosis between *Rhizobium meliloti* and alfalfa (*Medicago sativa*). *Journal of Bacteriology* **178**: 7159-7166.
- Gage, D.J. y Margolin, W.** (2000). Hanging by a thread: invasion of legume plants by rhizobia. *Current Opinion in Microbiology* **3**: 613-617.
- Gage, D.J.** (2002). Analysis of infection thread development using gfp- and dsRed-expressing *Sinorhizobium meliloti*. *Journal of Bacteriology* **184**: 7042-7046.
- Gamczarska, M. y Ratajczak, L.** (1996). Malate dehydrogenase in root nodules of yellow lupin. 10<sup>th</sup> FESPP Congress. *Plant Physiology and Biochemistry*. Special issue, S10-32. pp. 126.
- Gamczarska, M. y Ratajczak, L.** (1999). Changes in the activity and isozyme patterns of malate dehydrogenase in root nodules of yellow lupin. *Acta Physiologia Plantarum* **21**: 149-153.
- Gantt, J.S., Larson, R.J., Farnham, M.W., Pathirana, S.M., Miller, S.S. y Vance, C.P.** (1992). Aspartate aminotransferase in effective and ineffective alfalfa nodules. *Plant Physiology* **98**: 868-878.
- Gardner, W.K., Parbey, D.G. y Barber, D.A.** (1982). The acquisition of phosphorus by *Lupinus albus* L. (I and II). *Plant and Soil* **68**: 19-41.
- Garrity, G.M., Winters, M. y Searles, D.B.** (2001). *Taxonomic Outline of the Prokaryotic Genera*. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2<sup>nd</sup> Edition.
- Gaston, S., Zabalza, A. González, E.M., Arrese-Igor, C. Aparicio-Tejo, P.M. y Royuela, M.** (2002). Imazethapyr, an inhibitor of the branched-chain amino acid biosynthesis, induces aerobic fermentation in pea plants. *Physiologia Plantarum* **114**: 524-532.
- Geigenberger, P.** (2003). Regulation of sucrose to starch conversion in growing potato tubers. *Journal of Experimental Botany* **54**: 457-465.
- Geiger, D.R., Kapitan, S.W. y Tucci, M.A.** (1986). Glyphosate inhibits photosynthesis and allocation of carbon to starch in sugar beet leaves. *Plant Physiology* **82**: 468-472.
- Geiger, D.R., Tucci, M.A. y Servantes, J.C.** (1987). Glyphosate effects on carbon assimilation and gas exchange in sugar beet leaves. *Plant Physiology* **85**: 365-369.

- Geiger, D.R. y Bestman, H.D.** (1990). Self-limitation of herbicide mobility by phytotoxic action. *Weed Science* **38**: 324-329.
- Gerbeau, P., Amodeo, G., Henzler, T., Santoni, V., Ripoche, P. y Maurel, C.** (2002). The water permeability of *Arabidopsis* plasma membrane is regulated by divalent cations and pH. *The Plant Journal* **30**: 71-81.
- Girard, L., Valderrama, B. Palacios, R., Romero, D. y Dávila, G.** (1996). Transcriptional activity of the symbiotic plasmid of *Rhizobium etli* is affected by different environmental conditions. *Microbiology* **142**: 2847-2856.
- Glenn, A. R., McKay, L.A., Arwas, R. y Dilworth, M.J.** (1984). Sugar metabolism and the symbiotic properties of carbohydrate mutants of *Rhizobium leguminosarum*. *Journal of General Bacteriology* **130**: 239-245.
- Gogorcena, Y., Gordon, A.J., Escudero, P.R., Minchin, F.R., Witty, J.F., Morán, J.F. y Becana, M.** (1997). N<sub>2</sub> fixation, carbon metabolism and oxidative damage in nodules of dark-stressed common bean plants. *Plant Physiology* **113**: 1193-1201.
- Golvano, M.P. y de Felipe, M.R.** (1986). Effect of nitrogen nutrition on photosynthetic apparatus of wheat during tillering. En *Fundamental, Ecological and Agricultural Aspects of Nitrogen Metabolism in Higher Plants*. Eds. Lambers, H., Neetenson, J.J. y Stulen, I. Martinus Nijhoff Publishers. Netherlands. pp. 283-288.
- Golvano, M.P., Lang, P. y de Felipe, M.R.** (1991). Metabolismo del carbono en nódulos de leguminosas. En: Fijación y movilización biológica de nutrientes. Vol. II. Olivares, J. y Barea, J.M. (eds.). Nuevas Tendencias, CSIC. Madrid. 51-70.
- González, A, Gonzalez-Murua y Royuela, M.** (1996). Influence of imazethapyr on *Rhizobium* growth and its symbiosis with pea (*Pisum sativum*). *Weed Science* **44**: 31-37.
- González, E.M., Gordon, A.J., James, C.L. y Arrese-Igor, C.** (1995). The role of sucrose synthase in the response of soybean nodules to drought. *Journal of Experimental Botany* **46**: 1515-1523.
- González, E.M., Aparicio- Tejo, P.M., Gordon, A.J., Minchin, F.R., Royuela, M., y Arrese-Igor, C.** (1998). Water-deficit stress effects on carbon and nitrogen metabolism of pea nodules. *Journal of Experimental Botany* **49**: 1705-1714.
- González, E.M., Gálvez, L. y Arrese-Agor, C.** (2001). Absciscic acid induced a decline in nitrogen fixation that involves leghaemoglobin, but is independent of sucrose synthase activity. *Journal of Experimental Botany* **52**: 285-293.
- González, J.E., Semino, C.E., Wang, L.X., Castellano-Torres, L.E. y Walker, G.C.** (1998). Biosynthetic control of molecular weight in the polymerization of the octasaccharide subunits of succinoglycan, a symbiotically important exopolysaccharide of *Rhizobium meliloti*. *Proceedings of the National Academy of Sciences, U.S.A.* **95**: 13477-13482.
- González, M.C., Echevarría, C., Vidal, J. y Cejudo, F.J.** (2002). Isolation and characterization of a wheat phosphoenolpyruvate carboxylase gene. Modelling of the encoded protein. *Plant Science* **162**: 233-238.
- González, M.C., Sánchez, R. y Cejudo, F.J.** (2003). Abiotic stresses affecting water balance induce phosphoenolpyruvate carboxylase expression in roots of wheat seedlings. *Planta* **216**: 985-992.

- González-Melendi, P. y Shaw, P.** (2002). 3D gold in situ labelling in the EM. *The Plant Journal* **29**: 237-243.
- González-Sama, A.** (2003). Procesos iniciales del establecimiento de la simbiosis *Lupinus albus-Bradyrhizobium* sp. (*Lupinus*). Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias (Sección Biológicas). Universidad Autónoma de Madrid.
- Goormachtig, S., Valerio-Lepiniec, M., Szczygłowski, K., van Montagu, M., Holsters, M. y de Bruijn, F.J.** (1995). Use of differential display to identify novel *Sesbania rostrata* genes enhanced by *Azorhizobium caulinodans* infection. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **8**: 816-824.
- Gordon, A.J.** (1991). Enzyme distribution between the cortex and the infected region of soybean nodules. *Journal of Experimental Botany* **42**: 961-967.
- Gordon, A.J.** (1992). Carbon metabolism in the legume nodules. En *Carbon partitioning within and between organism*. Pollock C.J., Farrar J.F. y Gordon A.J. Eds Bios. Scientific Publishers, Oxford. pp. 133-162.
- Gordon, A.J. Ougham, H.J. y James, C.L.** (1993). Change in levels of gene transcripts and their corresponding proteins in nodules of soybean plants subjected to dark-induced stress. *Journal of Experimental Botany* **44**:1453-1460.
- Gordon, A.J.** (1995). Sucrose metabolism to support N<sub>2</sub> fixation in legume root nodules. En: Tikhonovich I.A., Provorov N.A., Romanov V.I. y Newton W.E. Eds. *Nitrogen fixation: fundamentals and applications*. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 533-538.
- Gordon, A.J. y James C.L.** (1997). Enzymes of carbohydrate and amino acid metabolism in developing and mature nodules of white clover. *Journal of Experimental Botany* **48**: 895-903.
- Gordon, A.J., Minchin, F.R., Skot, L. y James, C.L.** (1997) Stress-induced declines in soybean N<sub>2</sub> fixation are related to nodule sucrose synthase activity. *Plant Physiology* **114**: 937-946.
- Gordon, A.J., Minchin F.R., James C.L. y Komina O.** (1999). Sucrose synthase in legume nodules is essential for nitrogen fixation. *Plant Physiology* **120**: 867-877.
- Gordon, A.J., Skot, L., James C.L. y Minchin F.R.** (2002). Short-term metabolic responses of soybean root nodules to nitrate. *Journal of Experimental Botany* **53**: 423-428.
- Gouia, H., Suzuki, A., Brulfert, J. y Ghorbal, M.H.** (2003). Effects of cadmium on the co-ordination of nitrogen and carbon metabolism in bean seedlings. *Journal of Plant Physiology* **160**: 367-376.
- Graham, P.H. y Vance, C.P.** (2003) Legumes: Importance and Constraints to Greater Use. *Plant Physiology* **131**: 872-877.
- Gregerson, R.G., Petrowski, M., Larson, R.L., Gantt, J.S. y Vance, C.P.** (1993). Molecular analysis of allelic polymorphism at the AAT2 locus of alfalfa. *Molecular and General Genetics* **241**: 124-128.
- Gregerson, R.G., Miller, S.S., Petrowski, M., Gantt, J.S. y Vance, C.P.** (1994). Genomic structure, expression and evolution of the alfalfa aspartate aminotransferase genes. *Plant Molecular Biology* **25**: 387-399.
- Grossbard, E. y Atkinson, D.** (1985). *The Herbicide Glyphosate*. Butterworth y Co. Publishers. London. Reino Unido. pp.490.

- Gu, R., Fonseca, S., Puskas, L.G., Hackler, L. Jr. Zvara, A. Dudits, D. y Pais, M.S.** (2004). Transcript identification and profiling during salt stress and recovery of *Populus euphratica*. *Tree Physiology* **24**: 265-276.
- Guasch, L.M.** (1998). Factores estructurales, fisiológicos y genéticos en la regulación de la difusión de oxígeno en nódulos de *Lupinus albus* L. cv. Multolupa. Tesis Doctoral. Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos. Universidad Politécnica de Madrid.
- Guasch, L.M., de Felipe, M.R. y Fernández-Pascual, M.** (2001). Effects of different O<sub>2</sub> concentrations on nitrogenase activity, respiration, and O<sub>2</sub> diffusion resistance in *Lupinus albus* L. cv. Multolupa nodules. *Journal Plant Physiology* **158**: 1395-1402.
- Guenther, J.F., Chanmanivone, N., Galetovic, M.P., Wallace, I.S., Cobb, J.A. y Roberts, D.M.** (2003). Phosphorylation of soybean nodulin 26 on serine 262 enhances water permeability and is regulated developmentally and by osmotic signals. *The Plant Cell* **15**: 981-991.
- Haaker, H., Szafran, M.M., Wassink, H.J. y Appels, M.A.** (1995). Malate, aspartate and proton exchange between *Rhizobium leguminosarum* symbiosomes and its symbiotic partner *Pisum sativum*. En Nitrogen Fixation: Fundamentals and Applications. Eds. Tikhonovich. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, pp. 565-572.
- Haider, J., Frendrik, I. y Niemann, E.G.** (1991). Effect of linuron and dinosebacetate on *Vicia faba*-*Rhizobium leguminosarum* symbiosis. *Soil Science and Plant Nutrition* **37**: 601-609.
- Haigler, C.H., Ivanova-Datcheva, M., Hogan, P.S., Salnikov, V.V., Hwang, S., Martin, K. y Delmer, D.P.** (2001). Carbon partitioning to cellulose synthesis. *Plant Molecular Biology* **47**: 29-51.
- Hancock, R.E.W. y Brinkman, F.S.L.** (2002). Function of pseudomonas porins in uptake and efflux. *Annual Review of Microbiology* **56**: 17-38.
- Haney, R.L., Senseman, S.A., Hons, F.M., y Zuberer, D.A.** (2000). Effect of glyphosate on soil microbial activity and biomass. *Weed Science* **48**: 89-93.
- Haney, R.L., Senseman, S.A., Krutz, L.J. y Hons, F.M.** (2002). Soil carbon and nitrogen mineralization as affected by atrazine and glyphosate. *Biology and Fertility of Soils* **35**: 35-40.
- Hargrove, M.S., Barry, J.K., Brucker, E.A., Berry, M.B., Phillips, G.N., Olson, J.S., Arredondo-Peter, R., Dean, J.M., Klucas, R.V. y Sarath, G.** (1997). Characterization of recombinant soybean leghemoglobin a and polar distal histidine mutants. *Journal of Molecular Biology* **266**: 1032-1042.
- Harris, J.M., Wias, R. y Long, S.R.** (2003). *Rhizobium*-induced calcium spiking in *Lotus japonicus*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **16**: 335-341.
- Haslam, E.** (1993). Introduction, commentary, and overview. En *Shikimic Acid: Metabolism and Metabolites*. Haslam, E., Eds. John Wiley and Sons: New York, N.Y. pp.1-16.
- Haughton, A.J., Bell, J.R., Wilcox, A. y Boatman, N.D.** (2001). The effect of the herbicide glyphosate on non-target spiders: Part I. Direct effect on *Lepthyphantes tenuis* under laboratory conditions. *Pest Management Science* **57**: 1033-1036.
- He, M., Yang, Z.-Y., Nie, Y.-F., Wang, J. y Xu, P.** (2001). A new type of class I bacterial 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase mutants with enhanced tolerance to glyphosate. *Biochimica et Biophysica Acta* **1568**: 1-6.



- Heidstra, R., Nilsen, G., Martinez-Abarca, F., van Kammem, A. y Bisseling, T.** (1997). Nod Factor-Induced Expression of Leghemoglobin to Study the Mechanism of  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  Inhibition on Root Hair Deformation. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **10**: 215-220.
- Henson, C.A. y Collins, M.** (1984). Carbon metabolism in alfalfa root nodules: developmental patterns of host plant enzymes before and after shoot removal. *Crop Science* **24**: 727-732.
- Henzler, T., Waterhouse, R.N., Smyth, A.J., Carvajal, M., Cooke, D.T., Schöffner, A.R., Steudle, E. y Clarkson, D.T.** (1999). Diurnal variation in hydraulic conductivity and root pressure can be correlated with the expression of putative aquaporins in the roots of *Lotus Japonicus*. *Planta* **210**: 50-60.
- Hernández, A.** (1996). Modo de acción del glifosato en la simbiosis *Bradyrhizobium*-soja. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias. Universidad del País Vasco. Bilbao.
- Hernández, A., García-Plazaola, J.I. y Becerril, J.M.** (1999). Glyphosate effects on phenolic metabolism of nodulated soybean (*Glycine max* L. Merr.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **47**: 2920-2925.
- Herrmann, K. M. y Weaver, L. M.** (1999). The shikimate pathway. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **50**: 473-503.
- Hernández, A., García-Plazaola, J.I. y Becerril, J.M.** (1999). Glyphosate effects on phenolic metabolism of nodulated soybean (*Glycine max* L. Merr.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **47**: 2920-2925.
- Hernández-Castro, R., Rodríguez, M.C., Seoane, A. y García, J.M.** (2003). The aquaporin gene *aqpX* of *Brucella abortus* is induced in hyperosmotic conditions. *Microbiology* **149**: 3185-3192.
- Hernández-Jiménez, M. J., Lucas, M.M. y de Felipe, M.R.** (2002). Antioxidant defence and damage in senescing lupin nodules. *Plant Physiology and Biochemistry* **40**: 645-657.
- Hirsch, A.M.** (1999). Role of lectins (and rhizobial exopolysaccharides) in legume nodulation. *Current Opinion in Plant Biology* **2**: 320-326.
- Hoagland, D.R. y Arnon, D.I.** (1938). The water culture method for growing plants without soil. *California Agricultural Experiment Station Circ.* N° 347.
- Hoagland, D.E., Reddy, K.N. y Zablutowicz, R. M.** (1999). Effects of glyphosate on *Bradyrhizobium japonicum* interactions in Roundup-Ready soybeans. *Weed Science Society of America Abstracts* **39**.
- Holt, J. G., Krieg, N. R., Sneath, P. H. A., Staley, J. T. y Williams, S. T.** (1994). En Bergey's manual of determinative bacteriology ninth edition. Eds. Holt, J. G., Krieg, N. R., Sneath, P. H. A., Staley, J. T., Williams, S. T.. Publisher Williams & Wilkins: A Waverly Company.
- Hunt, S. y Layzell, D.B.** (1993). Gas exchange of legume nodule and the regulation of nitrogenase activity. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **44**: 483-511.
- Iannetta, P.P.M., de Lorenzo, C., James, E.K., Fernández-Pascual, M.M., Sprent, J.I., Lucas, M.M., Witty, J.F., de Felipe, M.R. y Minchin, F.R.** (1993). Oxygen diffusion in lupin nodules. I Visualization of diffusion barrier operation. *Journal of Experimental Botany* **44**: 1461-1467.
- Irigoyen, J.J, Emerich, D.W. y Sánchez-Díaz, M.** (1992). Alfalfa leaf senescence induced by drought stress: photosynthesis, hydrogen peroxide metabolism, lipid peroxidation and etylene evolution. *Physiologia Plantarum* **84**: 67-72.
- Jap, B. K. y Walian, P.J.** (1996). Structure and functional mechanism of porins. *Physiological Reviews* **76**: 1073-1088.

- Jauh, G.Y., Phillips, T.E. y Rogers, J.C.** (1999). Tonoplast intrinsic protein isoforms as markers for vacuolar functions. *Plant Cell* **11**: 1897-1882.
- Jensen, W.A.** (1962). Botanical Histochemistry: principles and practice. Freeman W.H. y Co., Eds. Williams and Wilkins, Baltimore.
- Jensen, R.A.** (1985). The shikimate/arogenate pathway: link between carbohydrate metabolism and secondary metabolism. *Physiologia Plantarum* **66**: 164-168.
- Johnson, J.F., Allan, D.L. y Vance, C.P.** (1994). Phosphorus stress-induced proteoid roots show altered metabolism in *Lupinus albus*. *Plant Physiology* **104**. 657-665.
- Ju, G.C., Li, X.Z., Rauser, W.E. y Oaks, A.** (1997). Influence of cadmium on the production of  $\gamma$ -glutamylcysteine peptides and enzymes of nitrogen assimilation in *Zea mays* seedlings. *Physiologia Plantarum* **101**: 793-799.
- Kaneko, T., Nakamura, Y., Sato, S., Minamisawa, K., Uchiumi, T., Sasamoto, S., Watanabe, A., Idesawa, K., Iriguchi, M., Kawashima, K., Kohara, M., Matsumoto M., Shimpo, S., Tsuruoka, H., Wada, T., Yamada, M. y Tabata, S.** (2002). Complete genomic sequence of nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110. *DNA Research*. **9**: 189-197.
- Kavroulakis, N., Flemetakis, E., Aivalakis, G. y Katinakis, P.** (2000). Carbon metabolism in developing soybean root nodules: the role of carbonic anhydrase. *Molecular Plant Microbe Interactions* **13**: 14-22.
- Kiers, E.T., Rousseau, R.A., West, S.A. y Denison, R.F.** (2003). Host sanctions and the legume-*Rhizobium* mutualism. *Nature* **425**:78-81.
- Kilmer, J., Widholm, J. y Slife, F.** (1981). Reserval of glyphosate inhibition of carrot on protein synthesis: effect of actidione. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **21**: 523-530.
- Kirch, H.H., Vera-Estrella, R., Golldack, D., Quigley, F., Michalowski, C.B., Barkla, B.J. y Bohnert, H.J.** (2000). Expression of water channel proteins in *Mesembryanthemum crystallinum*. *Plant Physiology* **123**: 111-124.
- Kleczkowski, L.A.** (1996). Black to the drawing board: redefining starch synthesis in cereals. *Trends in Plant Sciences* **1**:363-364.
- Klimek, M., Lejczak, B., Kajarski, P. y Forlani, G.** (2001). Metabolism of the phosphonate herbicide glyphosate by a non-nitrate-utilizing strain of *Penicillium chrysogenum*. *Pest Management Science* **57**: 815-821.
- Koebnik, R., Locher, K.P. y Van Gelder, P.** (2000). Structure and function of bacterial outer membrane proteins, barrels in a nutshell. *Molecular Microbiology* **37**: 239-253.
- Kondorosi, E., Trinh, H., Roudier, F., Foucher, F., Vaubert, D., Cebolla, A., Lodeiro, A., Fehér, A., Kelemen, Z., Györgyey, J., Mergaert, P., Kereszt, A., Dudits, D., Hirt, H. y Kondorosi, A.** (1998). Nod factor-induced cycle activation in root cortical cells. En *Biological nitrogen fixation for the 21<sup>st</sup> century*. Elmerich *et al.*, Eds. Kluwer Acaademic Publishers, Netherlands, pp. 189-92.
- Komina, O., Zhou, Y., Sarath, G. y Chollet, R.** (2002). In vivo and in vitro phosphorylation of membrane and soluble forms of soybean nodule sucrose synthase *Plant Physiology* **129**: 1664-1673.
- Krzysko-Lupicka, T. y Orlik, A.** (1997). The use of glyphosate as the sole source of phosphorus or carbon for the selection of soil-borne fungal strains capable to degrade this herbicide. *Chemosphere* **34**: 2601-2605.

- Kundu, S., Snyder, B., Das, K., Chowdhury, P., Park, J., Petrich, J.W. y Hargrove, M.S.** (2002). The leghemoglobin proximal heme pocket directs oxygen dissociation and stabilizes bound heme. *Proteins* **46**: 268-277.
- Kundu, S., Trent III, J.T. y Hargrove, M.S.** (2003). Plants, humans and hemoglobins. *Trends in Plant Science* **8**: 387-393.
- Kuykendall, L.D., Saxena, B., Devine, T.E. y Udell, S.E.** (1992). Genetic diversity in *Bradyrhizobium japonicum* and proposal for *Bradyrhizobium elkanii* sp-nov. *Canadian Journal of Microbiology*. **36**: 501-505.
- Kuster, H., Fruling, M., Perlick, A.M. y Puhler, A.** (1993). The sucrose synthase gene is predominantly expressed in the root nodule tissue of *Vicia faba*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **6**: 507-514.
- Layzell, D.B.** (1998). *Oxygen and the control of nodule metabolism and N<sub>2</sub> fixation*. En: Elmerich *et al.* Eds. Biological nitrogen fixation for the 21<sup>st</sup> century. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 435-440.
- Laemmli, U. K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T $\phi$ . *Nature* **227**, 680-685.
- Lang, P.** (1990). Efecto del nitrato sobre la fijación de Nitrogeno y sobre el metabolismo del carbona en nodulos de *Lupinus albus* L. cv. Multolupa. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias. Universidad Autonoma de Madrid.
- Lang, P., Martín, R. y Golvano, M.P.** (1993). Effect of nitrate on carbon metabolism and nitrogen fixation in lupin root nodules *Lupinus albus* L. cv. Multolupa. *Plant Physiology Biochemistry* **31**:639-648.
- Le Baron, H.M.** (1991). Herbicide resistant weeds continue to spread. *Resistant Pest Management Newsletter* **3**: 36-37.
- Lee, L.J. y Ngim, J.** (2000). A first report of glyphosate-resistant goosegrass (*Eleusine indica* L. Gaertn) in Malaysia. *Pest Management Science* **56**: 336-339.
- Lerouge, P., Roche, P., Faucher, C., Maillet, F., Truchet, G., Prome, J.C. y Denarie, J.** (1990). Symbiotic host-specificity of *Rhizobium meliloti* is determined by a sulphated and acylated glucosamine oligosaccharide signal. *Nature* **344**: 781-784.
- Lewis, G.P., Schrire, B.D., Mackinder, B.A. y Lock, J.M.,** (2003). *Legumes of the World*. Eds. Royal Botanic Gardens, Kew, UK.
- Liu, C.-M., McLean, P.A., Sookdeo, C.C. y Cannon, F.C.** (1991). Degradation of the herbicide glyphosate by members of the family Rhizobiaceae. *Applied and Enviromental Microbiology* **57**: 1799-1804.
- Loog, M., Toomik, R., Sak, K., Muszynska, G., Jarv, J. y Ek, P.** (2000). Peptide phosphorylation by Ca<sup>2+</sup>-dependendent protein kinase from maize seedlings. *European Journal of Biochemistry* **201**: 337-343.
- López- Millan, A.F., Morales, F., Andaluz, S., Gorgocena, Y., Abadia, A., de las Rivas, J. y Abadia, J.** (2000). Responses of sugar beet roots to iron deficiency. Changes in carbon assimilation and oxygen use. *Plant Physiology* **124**: 885-897.
- Lorraine-Colwill, D.F., Powles, S.B., Hawkes, T.R. y Preston, C.** (2001). Inheritance of evolved glyphosate resistance in *Lolium rigidum* (Gaud.). *TAG Theorical and Applied Genetics* **102**: 545-550.
- Lydon, J., y Duke, S.O.** (1988). Glyphosate induction of elevated levels of hydroxybenzoic acids in higher plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **36**: 813-818.

- Ma, J.F., Ryan, P.R. y Delhaize, E.** (2001). Aluminium tolerance in plants and the complexing role of organic acids. *Trends in Plant Science* **6**: 273-278.
- Mc Grath, J.W., Hammerschmidt, F. y Quinn, J.P.** (1998). Biodegradation of phosphomycin by *Rhizobium huakuii* PMY1. *Applied and Environmental Microbiology* **64**: 356-358.
- McCarthy, I., Romero-Puertas, M., Palma, J.M., Sandalio, L.M., Corpas, F.J., Gómez, M., y del Río, L.A.** (2001). Cadmium induces senescence symptoms in leaf peroxisomes of pea. *Plant Cell and Environment* **24**: 1065-1073.
- Madsen, K.H., Heitholt, J.J., Duke, S.O., Smeda, R.J. y Streibig, J.C.** (1995). Photosynthetic parameters in glyphosate-treated sugarbeet (*Beta vulgaris*) L. *Weed Research*. **35**:81-88.
- Madhavi, B., Anand, C.S., Bharathi, A. y Polasa, H.** (1993). Effect of pesticide on grown of rhizobia and their host plants during symbiosis. *Biomedical and Environmental Science* **6**: 89-94.
- Malik, J., Barry, G. y Kishore, G.** (1989). The herbicide glyphosate. *Biofactors* **2**: 17-25.
- Mallik, M.A.B. y Tesfai, K.** (1985). Pesticidal effect on soybean-rhizobia symbiosis. *Plant and Soil* **85**: 33-41.
- Marczewski, W.** (1989). Phosphoenolpyruvate carboxylase in lupine nodules and roots. Identification of the enzymatic forms. *Acta Biochimica Polonica* **36**: 31-36.
- Marino, D., Denia, E., González, E. y Arrese-Igor, C.** (2003). Efecto del paraquat aplicado en raíces sobre la fijación de nitrógeno en *Pisum sativum*. VII Congreso Hispano-Luso de Fisiología Vegetal. Universidad de las Islas Baleares.
- Martensson, A.M.** (1992). Effects of agrochemicals and heavy metals on fast-growing Rhizobia and their symbiosis with small-seeded legumes. *Soil Biology and Biochemistry* **24**: 435-445.
- Martensson, A.M. y Nilsson, A.K.** (1989). Effects of chlorsulfuron on *Rhizobium* grown in pure culture and in symbiosis with alfalfa (*Medicago sativa*) and red clover (*Trifolium pratense*). *Weed Science* **37**: 445-450.
- Marschner, H.** (1995). *Mineral Nutrition of Higher Plants*, 2<sup>nd</sup> Eds. Academic Press, London.
- Martins, M.L., Mourato, M.P. y de Varennes e Mendonca, A.P.** (2002). Characterization of aspartate aminotransferase isoenzymes from leaves of *Lupinus albus* L. cv. Estoril. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology* **35**: 220-227.
- Martínez Molina, E. y Olivare, J.** (1982). A note on evidence for involvement of pectolitic enzymes in infection process of *Medicago sativa* by *Rhizobium meliloti*. *Journal of Applied Bacteriology* **52**: 453-455.
- Meyer, J.E.W. y Schulz, G.E.** (1997). Energy profile of maltooligosaccharide permeation through maltoporin as derived from the structure and from a statistical analysis of saccharide-protein interactions. *Protein Science* **6**: 1084-1091.
- Michels, J., Geyer, A., Mocanu, V., Welte, W., Burlingame, A.L. y Przybylski, M.** (2002). Structure and functional characterization of the periplasmic N-terminal polypeptide domain of the sugar-specific ion channel protein (ScrY porin). *Protein Science* **11**: 1565-1574.
- Miller, S.S., Driscoll, B.T., Gregerson, R.G., Gantt, J.S. y Vance, C.P.** (1998). Alfalfa malate dehydrogenase (MDH): molecular cloning and characterization of five different forms reveals a unique nodule-enhanced MDH. *The Plant Journal* **15**: 173-184.

- Minchin, F.R., Iannetta, P. P.M., Fernández-Pascual, M., de Lorenzo, C., Witty, J. F., y Sprent, J. I.** (1992). A new procedure for the calculation of the diffusion resistance in legumes from flow-through gas analysis data. *Annals of Botany* **70**: 283-289.
- Mitsuya, S., Takeoka, Y. y Miyake, H.** (2000). Effects of sodium chloride on foliar ultrastructure of sweet potato (*Ipomoea batatas* Lam.) plantlets grown under light and dark conditions *in vitro*. *Journal of Plant Physiology* **157**: 661-667.
- Moorman, T.B., Becerril, J.M., Lyndon, J. y Duke, S.O.** (1992). Production of hydroxybenzoic acids by *Bradyrhizobium japonicum* strains after treatment with glyphosate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **40**: 289-293.
- Morell M. y Copeland L.** (1985). Sucrose synthase of soybean nodules. *Plant Physiology* **78**: 149-154.
- Moreno, E., Stackebrandt, E., Dorsch, M., Wolters, J., Busch, M. y Mayer, H.** (1990). *Brucella abortus* 16S rRNA and lipid A reveal a phylogenetic relationships with members of the alpha-2subdivision of the class *Proteobacteria*. *Journal of Bacteriology* **172**: 3569-3576.
- Morillo, E., Undabeytia, T. Maqueda, C. y Ramos, A.** (2000). Glyphosate adsorption on soils of different characteristics. *Chemosphere* **40**: 103-107.
- Muller, T.C., Massey, J.H., Hayes, R.M., Main, C.L. y Stewart, C.N.** (2003). Shikimate accumulates in both glyphosate-sensitive and glyphosate-resistant horseweed (*Conyza canadensis* L. Cronq.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **51**: 680-684.
- Muñoz-Rueda, A., González-Murua, C., Becerril, J.M. y Sánchez-Díaz, M.F.** (1986). Effects of glyphosate [N-(phosphonomethylglycine)] on photosynthetic pigments, stomatal response and photosynthetic electron transport in *Medicago sativa* and *Trifolium pratense*. *Physiologia Plantarum* **66**: 63-68.
- Muthukumar, G., Arunakumari, A. y Mahadevan, A.** (1982). Degradation of aromatic compounds by *Rhizobium* spp. *Plant Soil* **69**: 163-169.
- Nakagawa, T., Izumi, T., Banba, M., Umehara, Y., Kouchi, H., Izui, K. y Hata, S.** (2003). **Characterization and expression analysis of genes encoding phosphoenolpyruvate carboxylase and phosphoenolpyruvate carboxylase kinase of *Lotus japonicus*, a model legume.** *Molecular Plant-Microbe Interactions* **16**: 281-288.
- Nakai, T., Konishi, T., Zhang, X.Q., Chollet, R., Tonouchi, N., Tsuchida, T., Yoshinaga, F. Mori, H., Sakai, F. y Hayashi, T.** (1998). An increase in apparent affinity for sucrose of mung bean sucrose synthase is caused by in vivo phosphorylation or directed mutagenesis of Ser-11. *Plant and Cell Physiology* **39**: 1337-1341.
- Nap, J.P. y Bisseling, T.** (1990). Developmental biology of a plant-prokaryote symbiosis: the legume root nodule. *Science* **250**: 948-950.
- Nap, J.P. y Bisseling, T.** (1990). Nodulin function and nodulin gene regulation in root nodule development. En: Gresshoff P.M.. Eds. *Molecular Biology of Symbiotic Nitrogen Fixation*. Boca Raton, Florida, U.S.A., C.R.C. Press, pp. 181-229.
- Nap, J.P. y Bisseling, T.** (1990). The role of nodulins. *Plant Physiology* **79**:407-414.
- Natera, S.H.A., Guerreiro, N. y Djordjevic, M.A.** (2000). Proteome analysis of differentially displayed proteins as a tool for the investigation of symbiosis. *Molecular Plant-Microbe Interaction* **13**: 995-1009.

- Nelson, N.** (1994). Azotometric adaptation of the Somogyi method for determination of glucose. *Journal of Biological Chemistry* **153**: 375-380.
- Newton, W.E.** (2000). Nitrogen fixation in perspective. En: Pedrosa, F.O. Eds. Nitrogen fixation: from molecules to crop productivity. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, pp. 3-8.
- Nida, D.L., Kolacz, K.H., Buehler, R.E., Deaton, W.R., Shuler, W.R., Armstrong, T.A., Taylor, M.L., Ebert, C.C., Rogan, G.J., Padgett, S.R. y Fuchs, R.L.** (1996) Glyphosate-tolerant cotton: genetic characterization and protein expression. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **44**:1960-1966.
- Nikaido, H.** (2003). Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **67**: 593-656.
- Nimmo, H.G.** (2000). The regulation of phosphoenolpyruvate carboxylase in CAM plants. *Trends in Plant Science* **5**: 75-80.
- Nishiwaki, T., Sato, T., Yashima, H., Ikaraski, T., Ohyama, T., Harper, J.E., Akao, S. y Kouchi, H.** (1997). Changes in concentration of leghemoglobin components in hypernodulation mutants of soybeans. *Soil Science and Plant Nutrition* **43**: 1091-1096.
- Padgett, S.R., Kolacz, K.H., Delannay, X.D., Re, B., LaVallee, B.J., Tinius, C.N., Rhodes, W.K., Otero, Y.I., Barry, G.F., Eichholtz, D.A., Peschke, V.M., Nida, D.L., Taylor, N.B., y Kishore, G.M.** (1995). Development, identification and characterization of a glyphosate-tolerant soybean line. *Crop Science*. **35**: 1451-1461.
- Paek, K.Y., Canderlerd, S. y Thorpe, T.A.** (1988). Physiological effects of Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and NaCl on callus cultures of *Brassica campestris* (Chinese cabbage). *Physiologia Plantarum* **72**: 160-166.
- Pathirana, S.M., Vance, C.P., Miller, S.S. y Gantt, J.S.** (1992). Alfalfa root nodule phosphoenolpyruvate carboxylase: characterization of the cDNA and expression in effective and plant-controlled ineffective nodules. *Plant Molecular Biology* **20**: 437-450.
- Pastor, J., Hernández, A.J., Prieto, N. y Fernández-Pascual, M.** (2003). Accumulating behaviour of *Lupinus albus* L. growing in a normal and a decalcified calcic luvisol polluted with Zn. *Journal of Plant Physiology* **160**:1457-1465.
- Paquet, J. Y., Diaz, M. A., Genevrois, S., Grayon, M., Verger, J.M., de Bolle, X., Lakey, J.H., Letesson, J.J. y Cloeckert, A.** (2001). Molecular, antigenic, and functional analyses of Omp2b porin size variants of *Brucella* spp. *Journal of Bacteriology* **183**:4839-4847.
- Pérez, M.L.** (2003). Fotosistema II e infección viral: Análisis de fluorescencia de imagen y regulación de la biosíntesis de las proteínas OEC durante la patogénesis. Tesis Doctoral. Universidad de Granada.
- Perigio, B.J., Akao, Jr., Schoichiro, A. y Kolubun, M.** (1991). The timing of exogenous 2,4-Diclorophenoxyacetate (2,4-D) application affects nodulation of soybeans, *Glycine Max* (L.) Merr. *Soil Science and Plant Nutrition* **37**: 707-714.
- Phillips, D.A. y Kapulnik, Y.** (1995). Plant isoflavonoids, pathogens and symbionts. *Trends in Microbiology* **3**: 58-64.
- Pingret, J-L., Journet, E-P. y Barker, D.G.** (1998). *Rhizobium* Nod Factor Signaling: Evidence for a G Protein-Mediated Transduction Mechanism. *The Plant Cell*. **10**: 659-671.
- Pinheiro, C., Chaves, M.M. y Ricardo, C.P.** (2001). Alterations in carbon and nitrogen metabolism induced by water deficit in the leaves of *Lupinus albus* L.. *Journal of Experimental Botany* **52**: 1063-1070.

- Plaxton W.C.** (1996). The organization and regulation of plant glycolysis. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **47**: 185-214.
- Pline, W.A., Wilcut, J.W., Duke, S.O., Edmisten, K.L. y Wells, R.** (2002). Tolerance and accumulation of shikimic acid in response to glyphosate applications in glyphosate-resistant and nonglyphosate-resistant cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **50**: 506-512.
- Pozueta-Romero, J., Perata, P. y Akazawa, T.** (1999). Sucrose-starch conversion in heterotrophic tissues of plants. *Critical Reviews in Plant Sciences* **18**: 489-525.
- Powles, S.B., Preston, C., Bryan, I. B. y Jutsum, A.R.** (1997). Herbicide resistance: impact and management. *Advances in Agronomy* **58**: 57-93.
- Powles, S.B., Lorraine-Colwill, D.F., Dellow, J.J. y Preston, C.** (1998). Evolved resistance to glyphosate in rigid ryegrass (*Lolium rigidum*) in Australia. *Weed Science*. **46**: 604-607.
- Pozuelo, J.M., Fernandez-Pascual, M., Lucas, M.M. y de Felipe, MR.** (1989). Effects of eight herbicides from five different chemical groups on nitrogen fixation and grain yield in *Lupinus albus* L. grown in semi-arid zones. *Weed Research* **29**: 419-425.
- Pozueta-Romero, J., Perata, P. y Akazawa, T.** (1999). Sucrose-starch conversion in heterotrophic tissues of plants. *Critical Reviews in Plant Sciences* **18**: 489-525.
- Pratley, J., Baines, P., Eberbach, P., Incerti, M. y Broster, J.** (1996). Glyphosate resistance in annual ryegrass. En Proceedings of the 11<sup>th</sup> Annual Conference of the Grassland Society of NSW. The Grassland Society of NSW Inc., Orange, NSW, Australia. pp.122.
- Putnam, A.R. y Tang, C.S.** (1986). *The Science of Allelopathy*. Wiley. New York. U.S.A.
- Quigley, F., Rosenberg, J.M., Shahar-Hill, Y. y Bonhert, H.J.** (2002). From genome to function: The *Arabidopsis* aquaporins. *Genome Biology* **3**: 1-17.
- Quinn, J.P., Peden, J.M.M. y Dick, R.E.** (1988). Glyphosate tolerance and utilization by the microflora of soils treated with the herbicide. *Applies Microbiology and Biotechnology* **29**: 511-516.
- Ratajczak, L., Ratajczak, W. y Koroniak, D.** (1989). Detection of nodule-specific forms of malate dehydrogenase from root nodules of *Lupinus luteus*. *Biochemistry Physiologia Pflanzen* **184**: 243-248.
- Rae, A.L., Bonfante-Fasolo, P. y Brewin, N.J.** (1992). Structure and growth of infection threads in the legume symbiosis with *Rhizobium leguminosarum*. *The Plant Journal* **2**: 385-395.
- Ragland, M. y Theil, E.C.** (1993). Ferritin (mRNA) and iron concentrations during soybean nodule development. *Plant Molecular Biology* **21**: 555-560.
- Reynolds, E.S.** (1963). The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. *Journal of Cell Biology* **17**: 208-213.
- Reynolds, P.H.S. y Farnden, K.J.F.** (1979). The involvement of aspartate aminotransferases in ammonium assimilation in lupin nodules. *Phytochemistry* **18**: 1625-1630.
- Reynolds, P.H.S., Smith, L.A., Dickson, J.M.J.J., Jones, W.T., Jones, S.D., Rodber, K.A., Carne, A. y Liddane, C.P.** (1992). Molecular cloning of a cDNA encoding aspartate aminotransferase-P2 from lupin root nodules. *Plant Molecular Biology* **19**: 465-472.
- Reumann, S., Maier, E. Heldt, H.W. y Benz, R.** (1998). Permeability properties of the porin of spinach leaf peroxisomes. *European Journal of Biochemistry* **251**: 359-366.

- Riess, F.G., Dorner, U., Schiffler, B. y Benz, R.** (2001). Study of the properties of a channel-forming protein of the cell wall of the gram-positive bacterium *Mycobacterium phlei*. *Journal of Membrane Biology* **182**: 147-157.
- Robinson, D.L., Pathirana, S.M., Gantt, J.S. y Vance, C.P.** (1996). Immunogold localization of nodule-enhanced phosphoenolpyruvate carboxylase in alfalfa. *Plant, Cell and Environment* **19**: 602-608.
- Rosenbusch, J.P.** (1988). Secondary and tertiary structure of membrane proteins. *Zbl bakt* **17**: 259-266.
- Rosner, J.L., Chai, K.J. y Foulds, J.** (1991). Regulation of OmpF porin expression by salicylate in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **173**: 5631-5638.
- Royuela, M., Gonzalez, A., Arrese-Igor, C., Aparicio-Tejo, P.A. y Gonzalez-Murua, C.** (1998). Imazethapyr inhibition of acetolactate synthase in *Rhizobium* and its symbiosis with pea. *Pesticide Science* **52**: 372-380.
- Royuela, M., Gonzalez, A., Gonzalez, E.M., Arrese-Igor, C., Aparicio-Tejo, P.A. y Gonzalez-Murua, C.** (2000). Physiological consequences of continuous, sublethal imazethapyr supply to pea plants. *Journal of Plant Physiology* **157**: 345-354.
- Ryan, E., Bodley, F. y Fottrell, P.F.** (1972). Purification and characterisation of aspartate aminotransferases from soybean root nodules and *Rhizobium japonicum*. *Phytochemistry* **11**: 957-963.
- Ryan, E. y Fottrell, P.F.** (1974). Subcellular localization of enzymes involved in the assimilation of ammonia by soybean root nodules. *Plant Molecular Biology* **19**: 2647-2652.
- Rubin, J.L., Gaines, C.G. y Jensen, R.A.** (1982). Enzymological basis for herbicidal action of glyphosate. *Plant Physiology* **70**: 833-839.
- Saalbach, G., Erik, P. y Wienkoop, S.** (2002). Characterization by proteomics of peribacteroid space and peribacteroid membrane preparations from pea (*Pisum sativum*) symbiosomes. *Proteomics* **2**: 325-337.
- Saitou, N. y Nei, M.** (1987). The Neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* **4**: 406-425.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. y Maniatis, T.** (1989). Molecular Cloning. A Laboratory Manual. 2<sup>nd</sup> Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, U.S.A.
- Sandhu, P.S., Dhingra, K.K. Bhandari, S.C. y Gupta, R.P.** (1991). Effect of hand-hoeing and application of herbicides on nodulation, nodule activity and grain yield of *Lens culinaris* Med. *Plant and Soil* **135**: 293-296.
- Santana, M.A., Pihakaski-Maunsbach, K., Sandal, N., Marcker, K.A. y Smith, A.G.** (1998). Evidence that the plant host synthesizes the heme moiety of leghemoglobin in root nodules. *Plant Physiology* **116**: 1259-1269.
- Sánchez, F., Padilla, J.E., Pérez, H. y Lara, M.** (1991). Control of nodulin genes in root nodule development and metabolism. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **42**: 507-528.
- Santos, A. y Flores, M.** (1995). Effects of glyphosate on nitrogen fixation of free-living heterotrophic bacteria. *Letters in Applied Microbiology* **20**: 349-352.
- Sato, T., Yashima, H., Ohtake, N., Sueyoshi, K., Akao, S. y Ohyama, T.** (1999). Possible involvement of photosynthetic supply in changes of nodule characteristics of hypernodulating soybeans. *Soil Science and Plant Nutrition* **45**: 187-196.



- Sato, T., Onoma, N., Fujikake, H., Ohtake, N., Sueyoshi, K. y Ohyama, T.** (2001). Changes in four leghemoglobin components in nodules of hypernodulating soybean (*Glycine max* [L] Merr.) mutant and its parent in the early nodule developmental stage. *Plant and Soil* **237**:129-135.
- Sawada, H., Kuykendall, L.D. y Young, J.M.** (2003). Changing concepts in the systematics of bacterial nitrogen-fixing legume symbionts. *Journal of General and Applied Microbiology* **49**: 155-79.
- Schauser, L., Roussis, A., Stiller, J. y Stougaard, J.** (1999). A plant regulator controlling development of symbiotic root nodules. *Nature* **402**: 191-195.
- Scheible, W.R., Krapp, A. y Stitt, M.** (2000). Reciprocal dual changes of phosphoenolpyruvate carboxylase expression and cytosolic pyruvate kinase, citrate synthase and NADP-isocitrate dehydrogenase expression regulate organic acid metabolism during nitrate assimilation in tobacco leaves. *Plant, Cell and Environment* **23**: 1155-1167.
- Schirmer, T., Keller, T.A., Wang, Y.F. y Rosenbusch, J.P.** (1995). Structural basis for sugar translocation through maltoporin channels at 3.1 Å resolution. *Science* **267**: 512-514.
- Schirmer, T.** (1998). General and specific porins from bacterial outer membranes. *Journal of Structural Biology* **121**: 101-109.
- Schmid, J. y Amrhein, N.** (1995). Molecular organization of the shikimate pathway in higher plants. *Phytochemistry* **39**: 737-749.
- Seki, M., Narusaka, M., Ishida, J., Nanjo, T., Fujita, M., Oono, Y., Kamiya, A., Nakajima, M., Enju, A., Sakurai, T., Satou, M., Akiyama, K., Taji, T., Yamaguchi-Shinozaki, K., Carninci, P., Kawai, J., Hayashizaki, Y. y Shino, K.** (2002). Monitoring the expression profiles of 7000 Arabidopsis genes under drought, cold and high-salinity stresses using a full-length cDNA microarray. *Plant Journal* **31**: 279-292.
- Servaites, J.C., Tucci, M.A. y Geiger, D.R.** (1987). Glyphosate effects on carbon assimilation, ribulose biphosphate carboxylase activity, and metabolite levels in sugar beets leaves. *Plant Physiology* **85**: 370-374.
- Serraj, R., Fleurat-Leassard, P., Jaillard, B. y Drevon, J.J.** (1995). Structural changes in the inner cortex cells of soybean root nodules are induced by short term exposure to high salt or oxygen concentrations. *Plant, Cell and Environment* **18**: 455-462.
- Shaner, D.L.** (1995). Herbicide resistance: Where are we? How did we get here? Where are we going?. *Weed Technology* **9**: 850-856.
- Shaner, D.L. y Lyon, J.L.** (1979). Stomatal cycling in *Phaseolus vulgaris* L. in response to glyphosate. *Plant Science Letters* **15**: 83-87.
- Shieh, W.J., Geiger, D.R. y Servaites, J.C.** (1991). Effects of N-(Phosphonomethyl)glycine on carbon assimilation, and metabolism during a simulated natural day. *Plant Physiology* **97**: 1109-1114.
- Siehl, D.L.** (1997). Inhibitors of EPSP synthase, glutamine synthase and histidine synthesis. En *Herbicide Activity: Toxicology, Biochemistry and Molecular Biology*. Roe, R.M. Eds. IOS Press: Amsterdam. The Netherlands. pp. 37-67.
- Silvente, S., Camas, A. y Lara, M.** (2003). Heterogeneity of sucrose synthase genes in bean (*Phaseolus vulgaris* L.): evidence for a nodule-enhanced sucrose synthase gene. *Journal of Experimental Botany* **54**: 749-755.
- Sinclair, T.R. y Serraj, R.** (1995). Legume nitrogen fixation and drought. *Nature* **378**: 344.

- Singh, G. y Wright, D.** (1999). Effects of herbicides on nodulation, symbiotic nitrogen fixation, growth and yield of pea (*Pisum sativum*). *Journal of Agricultural Science* **133**: 21-30.
- Smart, L.B., Moskal, W.A., Cameron, K.D. y Bennett, A.B.** (2001). MIP genes are down-regulated under drought stress in *Nicotiana glauca*. *Plant and Cell Physiology* **42**: 686-693.
- Smith, E.A. y Oehme, F.W.** (1992). The biological activity of glyphosate to plants and animals: a literature review. *Veterinary and Human Toxicology* **34**: 531-543.
- Smith, P.M.C., Winter, H., Storer, P.J., Bussell, J.D., Schuller, K.A. y Atkins, C.A.** (2002). Effect of short-term N<sub>2</sub> deficiency on expression of the ureide pathway in cowpea root nodules. *Plant Physiology* **129**: 1216-1221.
- Somogyi, M.** (1952). Notes of sugar determinacion. *Journal of Biological Chemistry* **195**: 19-32.
- Spaink, H.P.** (1992). Rhizobial lipo-oligosaccharides: answers and questions. *Plant Molecular Biology*. **20**: 977-986.
- Sprout, S.L., Nelson, L.M. y Germina, J.J.** (1992). Influence of metribuzin on the *Rhizobium leguminosarum*-lentil (*Lens culinaris*) symbiosis. *Canadian Journal Microbiology* **38**: 343-349.
- Spaink, H.P.** (2002). A receptor in symbiotic dialogue. *Nature* **417**: 910-911.
- Stasiak, M.A., Hofstra, G. y Fletcher, R.A.** (1992). Physiological changes in birch seedlings by sublethal applications of glyphosate. *Canadian Journal of Research* **22**: 812-817.
- Stitt, M. y Hurry, V.** (2002). A plant for all seasons: alterations in photosynthetic carbon metabolism during cold acclimation in *Arabidopsis*. *Current Opinion in Plant Biology* **5**: 199-206.
- Stracke, S., Kistner, C., Yoshida, S., Mulder, L., Sato, S., Kaneko, T., Tabata, S., Sandal, N., Stougaard, J., Szczyglowski, K. y Parniske, M.** (2002). A plant receptor-like kinase required for both bacterial and fungal symbiosis. *Nature* **417**: 959-962.
- Suganuma, N., Sonoda, N., Nakane, C., Hayashi, K., Hayashi, T., Tamaoki, M. y Kouchi, H.** (1998). Bacteroids isolated from ineffective nodules of *Pisum sativum* mutant E135 (*sym13*) lack nitrogenase activity but contains the two protein components of nitrogenase. *Plant and Cell Physiology* **39**: 1093-1098.
- Suga, S., Komatsu, S. y Maeshima, M.** (2002). Aquaporins isoforms responsive to salt an water stresses and phytohormones in radish seedlings. *Plant Cell Physiol* **43**: 1229-1237.
- Subbaiah, C.C. y Sachs, M.M.** (2001). Altered patterns of sucrose synthase phosphorylation and localization precede callose induction and root tip death in anoxic maize seedlings. *Plant Physiology* **125**: 585-594.
- Swaraj, K. y Bishnoi, N.R.** (1999). Effect of salt stress on nodulation and nitrogen fixation in legumes. *Indian Journal of Experimental Biology* **37**: 843-848.
- Schultz, C.J., Hsu, M., Miesak, B. y Coruzzi, G.M.** (1998). *Arabidopsis* mutants define an *in vivo* role for isoenzymes of aspartate aminotransferase in plant nitrogen assimilation. *Genetics* **149**: 491-499.
- Taniguchi, M., Kobe, A., Kato, M. y Sugiyama, T.** (1995). Aspartate aminotransferase isoenzymes in *P. miliaceum* L. an NAD-malic enzyme type-C<sub>4</sub> plant: comparison of enzymatic properties, primary structures, and expression patterns. *Archives in Biochemistry and Biophysics* **318**: 295-306.

- Towbin, H., Staehelin T. y Gordon J.** (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets: procedures and some applications. *Proceeding of the National Academy of Science, U.S.A.* **76**: 4350-4354.
- Tran, M., Baerson, S., Brinker, R., Casagrande, L., Faletti, M., Feng, Y. Nemeth, M., Reynolds, T., Rodriguez, D., Schafer, D. et al.** (1999). Characterization of glyphosate resistant *Eleusine indica* biotypes from Malaysia. En Proceeding 1(B) 17<sup>th</sup> Asian-Pacific Weed Science Society Conference, The Asian-Pacific Weed Science Society , Los Banos, Philippines. Pp. 527-536.
- Truchet, G., Camut, S., de Billy, F., Odorico, R. y Vasse, J.** (1989). The *Rhizobium*-legume symbiosis: two methods to discriminate between nodules and other root-derived structures. *Protoplasma* **149**: 82-88.
- Tsui, M.T.K. y Chu, L.M.** (2003). Aquatic toxicity of glyphosate-based formulations: comparison between different organisms and the effects of environmental factors. *Chemosphere* **52**: 1189-1197.
- Tyerman, S.D., Bohnert, H.J., Maurel, C., Steudle, E. y Smith, J.A.C.** (1999). Plant aquaporins: their molecular biology, biophysics and significance for plant water relations. *Journal of Experimental Botany* **50**: 1055-1071.
- Tyerman, S.D., Niemietz, C.M. y Bramley, H.** (2002). Plant aquaporins: multifunctional water and solute channels with expanding roles. *Plant, Cell and Environment* **25**: 173-194.
- Udvardi, M.K. y Kahn, M.L.** (1991) Isolation and analysis of a cDNA clone that encodes an alfalfa (*Medicago sativa*) aspartate aminotransferase. *Molecular and General Genetics* **231**: 97-105.
- Udvardi, M.K. y Day, D.A.** (1997) Metabolite transport across symbiotic membranes of legumes nodules. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **48**: 493-523.
- van Berkum, P. y Eardly, B.D.** (1998). Molecular evolutionary systematics of the Rhizobiaceae. En *The Rhizobiaceae, Molecular Biology of Model Plant-Associated Bacteria*. Eds. Spaink, H.P., Kondorosi, A. y Hooykaas, P.J.J. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp. 1-24.
- Van Quy, L. y Champigny, M.L.** (1992). Nitrate enhances the kinase activity for phosphorylation of phosphoenolpyruvate carboxylase and sucrose phosphate synthase proteins in wheat leaves. *Plant Physiology* **99**: 344-347.
- van Rhijn, P., Goldberg, R.B. y Hirsch, A.M.** (1998). *Lotus corniculatus* nodulation specificity is changed by the presence of a soybean lectin gene. *Plant Cell* **10**: 1233-1249.
- Vasse, J., de Billy, F., Camut, S. y Trunchet G.** (1990) Correlation between ultrastructural differentiation of bacteroids and nitrogen fixation in alfalfa nodules. *Journal of Bacteriology* **172**: 4295-4306.
- VandenBosch, K.A., Bradley, D.J., Knox, J.P., Perotto, S., Butcher, G.W. y Brewin, N.J.** (1989). Common components of the infection thread matrix and the intercellular space identify by immunocytochemical analysis of pea nodules and uninfected roots. *The EMBO Journal* **8**: 967-978.
- Vance C.P., Boylan, K.L., Maxwell, C.A., Heichel, G.H. y Hardman, L.L.** (1985) Transport and partitioning of CO<sub>2</sub> fixed by root nodules of ureide and amide producing legumes. *Plant Physiology* **78**: 774-778.
- Vance C.P. y Heichel G.H.** (1991) Carbon in N<sub>2</sub> fixation: limitation and exquisite adaptation. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **42**: 373-392.
- Vance C.P., Gregerson, R.G., Robinson, D.L., Miller, S.S. y Gant, J.S.** (1994) Primary assimilation of nitrogen in alfalfa nodules: molecular features of the enzymes involved. *Plant Science* **101**: 51-64.

- Vance C.P.** (2001) Symbiotic nitrogen fixation and phosphorus acquisition, plant nutrition in a world of declining renewable resources. *Plant Physiology* **127**: 390-397.
- Vaughn, K. y Duke, S.O.** (1986). Ultrastructural effects of glyphosate on *Glycine max* seedlings. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **26**: 56-65.
- Veiga, F., Zapata, J.M., Fernandez Marcos, M.L. y Alvarez, E.** (2001). Dynamics of glyphosate and aminomethylphonic acid in a forest soil in Galicia, north-west Spain. *The Science of the Total Environment* **271**: 135-144.
- Verdoy, D., Lucas, M.M., Manrique, E., Covarrubias, A.A., de Felipe, M.M. y Pueyo, J.J.** (2004). Differential organ-specific response to salt stress and water deficit in nodulated bean (*Phaseolus vulgaris*). *Plant, Cell and Environment* **27**: 757-767.
- Vidal, J., Martínez, J., Bergareche, C., Miranda, A.M. y Simon, E.** (1992). Effect of methabenzthiazuron on growth and nitrogenase activity in *Vicia faba*. *Plant and Soil* **144**: 235-245.
- Vidal, J. y Chollet, R.** (1997). Regulatory phosphorylation of C<sub>4</sub> PEP carboxylase. *Trends in Plant Science* **2**: 230-237.
- Vieweg, M.F., Frühling, M., Quandt, H., Heim, U., Bäumlein, H., Pühler, A., Küster, H. y Perlick, A.M.** (2004). The promoter of the *Vicia faba* L. leghemoglobin gene *VfLb29* is specifically activated in the infected cells of root nodules and in the arbuscule-containing cells of mycorrhizal roots from different legume and nonlegume plants. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **17**: 62-69.
- Vincent, J.M.** (1970). A manual for the practical study of root nodule bacteria. IBP handbook 15. Blackwell Scientific Publications Ltd., Oxford.
- Vivo, A., Andreu, J.M., de la Viña, S. y de Felipe, M.R.** (1989). Leghemoglobin in lupin plants (*Lupinus albus* L. cv Multolupa). *Plant Physiology* **90**: 452-457.
- Vizcaino, N., Cloeckert, A., Zygmunt, M.S. y Dubray, G.** (1996). Cloning, nucleotide sequence, and expression of the *Brucella melitensis omp31* gene coding for an immunogenic major outer membrane protein. *Infection and Immunity* **64**: 3744-3751.
- Wadsworth, G.J., Marmaras, S.M. y Matthews, B.F.** (1993). Isolation and characterization of a soybean cDNA clone encoding the plastic form of aspartate aminotransferase. *Plant Molecular Biology* **21**: 993-1009.
- Wadsworth, G.J., Gebhardt, J.S. y Matthews, B.F.** (1994). Characterization of a soybean cDNA clone encoding the mitochondrial isozyme of aspartate aminotransferase, AAT4. *Plant Molecular Biology* **27**: 1085-1095.
- Walsh, K.B.** (1995). Physiology of the legume nodule and its response to stress. *Soil Biology and Biochemistry* **27**: 637-655.
- Wan Kim, T. y Amrhein, N.** (1995). Glyphosate toxicity: Long-term analysis of shikimic acid accumulation and chlorophyll degradation in tomato plants. *Korean Journal of Weed Science* **15**: 141-147.
- Wandrey, M., Trevaskis, B., Brewin, N. y Udvardi, M.K.** (2004). Molecular and cell biology of a family of voltage-dependent anion channel porins in *Lotus japonicus*. *Plant Physiology* **134**: 182-193.
- Wang, T. y Martínez-Romero, E.** (2000). Phylogeny of root and stem-nodule bacteria associated with legumes. En *Prokaryotic Nitrogen Fixation: A Model System for Analysis of a Biological Process*. Ed. Triplett, E.W. Horizon Scientific Press, Wymondham, U.K., pp. 177-186.

- Wardle, D.A. y Parkinson, D.** (1991). Relative importance of the effect of 2,4-D, glyphosate, and environmental variables on the soil microbial biomass. *Plant and Soil* **134**: 209-219.
- Wardle, D.A. y Parkinson, D.** (1992). Influence of the herbicides 2,4-D and glyphosate on soil microbial biomass and activity. *Soil Biology and Biochemistry* **24**: 185-186.
- Waters, J.K., Karr, D.B. y Emerich, D.W.** (1985). Malate deshidrogenase from *Rhizobium japonicum* 311b-143 bacteroids and *Glicine max* root-nodule mitochondria. *Biochemistry* **24**: 6479-6486.
- Watts, R.A., Hunt, P.W., Hvitved, A.N., Hargrove, M.S., Peacock, W. J. y Dennis, E.S.** (2001). A hemoglobin from plants homologous to truncated hemoglobins of microorganisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences, U.S.A* **98**: 10119-10124.
- Wienkoop, S. y Saalbach, G.** (2003). Proteome analysis. Novel proteins identified at the peribacteroid membrane from *Lotus japonicus* root nodules. *Plant Physiology* **131**: 1080-1090.
- Winter, H., Huber, J.L. y Huber, S.C.** (1997). Membrane association of sucrose synthase: changes during the graviresponse and possible control by protein phosphorylation. *FEBS Letters* **420**: 151-155.
- Winter, H., Huber, J.L. y Huber, S.C.** (1998). Identification of sucrose synthase as an actin binding protein. *FEBS Letters* **430**: 205-208.
- Winter, H. y Huber, S.C.** (2000). Regulation of sucrose metabolism in higher plants: localization and regulation of activity of key enzymes. *Critical Reviews in Plant Sciences* **19**: 31-67.
- Witty, J.F., Minchin, F.R., Skot, L. y Sheehy, J.E.** (1986). Nitrogen fixation and oxygen in legume root nodules. *Oxford Survey Plant Molecular and Cell Biology* **3**: 275-314.
- Wong, P.K.** (2000). Effects of 2,4-D, glyphosate and paraquat on growth, photosynthesis and chlorophyll-a synthesis of *Scenedesmus quadricauda* Berb 614. *Chemosphere* **41**:177-182.
- Xu, L.M., Ge, C., Cui, Z., Li, J. y Fan, H.** (1995). *Bradyrhizobium liaoningense* sp. nov., isolated from the root nodules of soybeans. *International Journal of Systematic Bacteriology* **45**: 706-711.
- Yeoman, K.H., Wisniewski-Dye, F., Timony, C., Stevens, J.B., deLuca, N.G., Downie, J.A. y Johnston, A.W.B.** (2000). Analysis of the *Rhizobium leguminosarum* siderophore-uptake gene *fhuA*: differential expression in free-living bacteria and nitrogen-fixing bacteroids and distribution of *fhuA* pseudogene in different strains. *Microbiology* **146**: 829-837.
- Zahran, H. H.** (1999). Rhizobium-legume symbiosis and nitrogen fixation under severe conditions and in an arid climate. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **63**: 968-989.
- Zahran, H. H.** (2001). Rhizobia from wild legumes: diversity, taxonomy, ecology, nitrogen fixation and biotechnology. *Journal of Biotechnology* **91**: 143-153.
- Zhang, X-Q., Li, B. y Chollet, R.** (1995). In vivo regulatory phosphorylation of soybean nodule phosphoenolpyruvate carboxylase. *Plant Physiology* **108**: 1561-1568.
- Zhang, X-Q., y Chollet, R.** (1997). Seryl-phosphorylation of soybean nodule sucrose synthase (nodulin-100) by a  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent protein kinase. *FEBS Letters* **410**: 126-130.
- Zhang, W-H. y Tyerman, S.D.** (1999). Inhibition of water channels by  $\text{HgCl}_2$  in intact wheat root cells. *Plant Physiology* **120**: 849-857.
- Zornoza, P., Vázquez, S., Esteban, E., Fernández-Pascual, M., y Carpena, R.** (2002). Cadmium-stress in nodulated white lupin. Strategies to avoid toxicity. *Plant Physiology and Biochemistry* **40**: 1003-1009.